

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年8月30日 (30.08.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/62907 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09,  
C07K 16/00 // C12P 21/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/01298

(22) 国際出願日: 2001年2月22日 (22.02.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-50543 2000年2月22日 (22.02.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 医学生物学研究所 (MEDICAL &amp; BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒460-0002 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5階 Aichi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 黒澤良和 (KUROSAWA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒465-0075 愛知県名古屋市名東区藤巻町3-2-1271 Aichi (JP). 赤堀 泰 (AKAHORI, Yasushi) [JP/JP]; 〒468-0056 愛知県名古屋市天白区島田5-1508 Aichi (JP). 伊庭善孝 (IBA, Yoshitaka) [JP/JP]; 〒458-0002 愛知県名古屋市緑区桃山3-513-101 Aichi (JP). 森野和彦 (MORINO, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒470-1123 愛知県豊明市西川町笹原21-14-301 Aichi (JP). 篠原みどり (SHINOHARA, Midori) [JP/JP]; 〒470-1131 愛知県豊明市二村台2-14-12-303 Aichi (JP). 高橋元秀 (TAKAHASHI, Motohide) [JP/JP]; 〒359-0047

埼玉県所沢市花園2-2406-64 Saitama (JP). 奥野良信 (OKUNO, Yoshinobu) [JP/JP]; 〒560-0085 大阪府豊中市上新田1-24-E-804 Osaka (JP). 白木公康 (SHIRAKI, Kimiyasu) [JP/JP]; 〒930-0881 富山県富山市安養坊34-16 Toyama (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書  
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIBODY LIBRARY

(54) 発明の名称: 抗体ライブラリー

(57) Abstract: An antibody library is prepared by selecting a light chain variable region capable of binding to the variable region of heavy chain to reproduce an active conformation and using the same. Because of being capable of maintaining the diversity of the heavy chain variable region at a high ratio *in vitro*, this antibody library is expected as enabling the acquisition of antibodies with various binding activities.

(57) 要約:

重鎖の可変領域と結合して活性なコンフォーメーションを再現しうる軽鎖可変領域を選択し、それを用いて抗体ライブラリーを調製する。本発明の抗体ライブラリーは、重鎖可変領域の多様性を生体外において高度に維持することができる。そのため、様々な結合活性を持つ抗体の取得が期待できる。



WO 01/62907 A1

- 1 -

## 明細書

## 抗体ライブラリー

技術分野

本発明は、抗体可変領域をコードする DNA を含む抗体ライブラリーに関する。

背景技術

動物個体は体液中に侵入する様々な異物に対して、その物質の表面に位置する種々の構造（エピトープ）を認識して特異的に結合する抗体を産生する能力がある。その抗体レパートリーの大きさ（異なる抗原に結合する違ったアミノ酸配列を持つ抗体の種類の総数）は、動物個体あたり 100 万種～1 億種と見積もられている。このような巨大な抗体レパートリーは、骨髓幹細胞が抗体産生細胞である B リンパ細胞へ分化する途上に、抗体遺伝子座で重鎖では VH-D-JH、軽鎖では VL-JL という DNA 再編成を起こすことによって生じる。この DNA 再編成は B 細胞毎に独立に起こるプロセスである。したがって一組の VH-D-JH、VL-JL 遺伝子を持つ 1 個の B 細胞は 1 種類の抗体しか産生しない。しかし個体を構成する B 細胞全体では、多様な抗体の産生が可能となる。

従来行われてきた抗血清調製技術、および細胞融合によるモノクローン抗体作製技術は、この動物の持つ抗体産生機構を利用している。すなわち、抗原物質をアジュバンドと共に動物（ウサギ、ヤギ、マウス等）に一定間隔をおいて数回注入する。動物の免疫系がその物質を異物と認識すると、その抗原物質に結合する抗体を発現した B 細胞が増殖分化刺激を受け、大量の抗体の体液中への分泌を開始する。抗原物質の表面には様々な構造が存在し、精製された抗原といえどもそれに結合する抗体は、通常は多種類の抗体の混合物として分泌される。このような抗体を含む血清（抗血清）はポリクローン抗体と呼ばれる。現在もポリクロ

- 2 -

ーン抗体は、研究試薬として有効に利用されている。しかしポリクローン抗体は、目的とする抗原物質以外にも、部分的に（抗体にとって）類似した構造を持つ分子とも交叉反応性(cross-reactivity)を示すことが多い。交叉反応は、ポリクローン抗体を抗原検出試薬として用いるときの問題点となっていた。

細胞融合技術の確立がこの状況を一変させた。抗原物質で免疫した動物の脾臓には抗原と結合する抗体を産生する B リンパ球は多数存在する。しかしその細胞を試験管内で長期間維持培養し続けることは困難である。そこで永代培養が可能なように株化した腫瘍細胞と抗体産生細胞を融合することにより、抗体を産生し永代培養可能な細胞を作製するというアイデアが生まれ、方法として確立した。このようにして確立した融合株（ハイブリドーマ）は 1 個の抗体産生細胞と 1 個の腫瘍細胞に由来するので産生される抗体は 1 種類であり、モノクローン抗体と呼ばれる。これはケラーとミルスタインにより 1975 年に開発された技術である。モノクローン抗体は、均一な抗体分子の集合体であることから、交叉反応を生じにくい特異性に優れた抗体として利用されている。しかしこの方法にも次のような問題点が指摘されている。

- (1) 抗原物質として必要充分量の精製標品を有していること
- (2) その物質が免疫される動物に対して免疫原性を示す必要があること
- (3) モノクローン抗体を得るまでに多大な労力と日数を要すること

ポリクローン抗体やモノクローン抗体の作製技術の有効性は、多くの有用な抗体を提供してきたことによって証明されている。しかし、これらの方法によっては解決が困難な多くの課題が今なお存在することも事実である。たとえば、多種類の抗原に対する抗体を短期間に得ること、あるいは特殊な構造をしたエピトープに特異的に結合する抗体を選択的に得ること、といった要求には、これらの方法では応えることはできない。希望する抗体を短期間で得ることができるよう、多様な抗体分子で構成された抗体ライブラリーの作製が望まれていた。このような抗体ライブラリーに含まれる抗体の種類は、理論的には動物個体の有する抗体

- 3 -

レパートリーの大きさに匹敵する必要がある。しかし現実には、動物細胞を用いてそのような巨大なライブラリーを作製することは不可能である。モノクローン抗体の作製は、動物の持つ抗体産生細胞のライブラリーから、期待する反応性を持つ抗体をスクリーニングする作業に他ならない。しかし、そのライブラリーを構成するレパートリーは、細胞融合などの操作を通じて大幅に失われてしまう。

そこで、大腸菌による抗体遺伝子の発現系が提案された。大腸菌中で抗原結合力のある抗体を発現させるのに初めて成功したのは Better et al (1988) (Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH Science 1988, 240:4855 1041-3) と Skerra と Plukthun (1988) (Skerra A, Plukthun A Science 1988, 240:4855 1038-41) である。彼らは大腸菌で分泌シグナルとして機能する配列を抗体の N 末端に付加することにより Fab 型と Fv 型抗体を大腸菌中での産生、それに続く分泌に成功した。

更に、1988 年の PCR の開発は、直ちに抗体可変領域をコードする遺伝子の増幅に応用される。動物（とりわけヒト）中で発現されている全ての VHDJH、VLJL 遺伝子を増幅するためのプライマー配列が提案された (Orlandi R et al. Proc Natl Acad Sci USA 1989 86:10 3833-7, Sastry L et al. Proc Natl Acad Sci USA 1989 86:15 5728-32)。そしてこれらのプライマーによって増幅した抗体遺伝子を利用して、大腸菌中で抗体を産生させるためのベクターが構築された (Huse WD et al. Science 1989 246:4935 1275-81, Ward GE et al. J Clin Microbiol 1989 27:12 2717-23)。この段階で、抗体ライブラリーのレパートリーサイズは飛躍的に向上した。しかし、大腸菌中で産生される微量の抗体について抗原との結合活性を指標とするスクリーニングを行うことは、容易なことではなかった。スクリーニングを能率的に行うには、ファージディスプレイ法が抗体ライブラリー作製に応用されるのを待つ必要があった。

ファージディスプレイ法は Smith により 1985 年 (Smith GP Science 1985 228:4075 1315-7) に考案されたもので、M13 ファージのような一本鎖環状 DNA を持

- 4 -

つ線状のバクテリオファージが用いられる。ファージ粒子は DNA の周囲を取り囲んでファージ粒子の大部分を構成する cp8 というタンパクと、ファージが大腸菌に感染する時に機能する 5 個の cp3 と呼ばれるタンパクからなっている。この cp3 もしくは cp8 と融合した形でポリペプチドをコードするように遺伝子を構築し、ファージ粒子表面にそのタンパクを発現させるシステムがファージディスプレイシステムである。結合性のタンパク質を表面に保持したファージ粒子は、そのリガンドとの結合活性を利用して濃縮することができる。こうして目的とする DNA を濃縮する方法は、パニング法と呼ばれている。濃縮されたファージ粒子には、必要な結合活性を持つタンパク質をコードする DNA がパッケージングされている。このように繊維状ファージの利用によって、結合活性に基づくスクリーニングと、DNA のクローニングとをきわめて効率的に行うことができるシステムが実現した（特表平 5-508076）。繊維状ファージを使ったライブラリーには、Fab 分子として発現が可能な方法も報告された（特表平 6-506836）。この報告において、cp3 等の N 末端を欠損させて可変領域を融合させる方法が試みられた。

ファージディスプレイ系が抗体に応用され、VH ドメインのみ、scFv、Fv、Fab 型抗体が cp3 又は cp8 と融合された形で発現された。抗原と結合するファージ抗体は同時に抗体をコードする遺伝子を含む。しかしファージディスプレイ系を用いて作製された初期に抗体ライブラリーから単離された抗体は、抗原結合力の低いものが多かった。結合力を高める試みの一つとして、人為的に遺伝子に変異を与える方法が提案された。Winter らは(1994)、単離した全ての VH、VL 遺伝子と、JH、JL 遺伝子の間にランダムな配列を挿入する半人工的配列を持つ抗体ライブラリーを作製することにより、親和性に優れた抗体の取得を可能とする抗体ライブラリーを得た(Nissim A, Winter G et al. EMBO J 1994 13:3 692-8)。De Kruif ら(1995)も基本的に同じ原理に基づいて抗体ライブラリーを作製している(de Kruif J, Boel E, Logtenberg T J Mol Biol 1995 248:1 97-105)。Vau

- 5 -

ghan ら (1996) は、ライブラリーの大きさを拡大することで十分な大きさの抗体レパートリーを確保しようとしている (Vaughan TJ et al. Nat Biotechnol 1996 14:3 309-14)。このような試みは、確かに限られた抗原に対しては成功を収めた。しかし必要とする抗体を得ることができる可能性は未だに不十分である。たとえば、マウスにおいてモノクローン抗体を得ることができるのと同じような確率でヒト抗体を得ることができるライブラリーを現在の技術で構築することは不可能である。したがって、より多様な抗体から構成されるライブラリーの提供が望まれている。

ヒトが産生することが可能な抗体を完全に *in vitro* でライブラリー化し、様々な抗原に特異的に結合する抗体が得られるようにするには、ヒトが抗体を産生する過程を試験管内で忠実に反映できれば理想的である。抗体が抗原と結合する部位は HL 両鎖の N 末端に位置する可変 (V) ドメインの中の各々抗原相補性決定領域 (complementarity determining region; 以下 CDR と省略する) I、II、III の計 6 ヶ所である。CDR を構成するアミノ酸配列の多様性 (長さに関する多様性も含めて) の総数が、そのまま抗体レパートリーの大きさを反映していると考えてよい。

抗体レパートリーを考える時に、体内への抗原侵入前の「ナイーブレパートリー」と抗原侵入後に起こる「抗体の成熟」を考慮する必要がある。抗体をコードする活性型抗体遺伝子は DNA 再編成によって作り出される。軽鎖には  $\lambda$  鎖と  $\kappa$  鎖があるが、その V 領域をコードする遺伝子は VL 遺伝子と JL 遺伝子に分かれている。  $\lambda$  鎖において V $\lambda$  遺伝子は 36 個存在し、J $\lambda$  遺伝子は 7 個存在する。B 細胞への分化途上、軽鎖に関しては  $\kappa$  鎖か  $\lambda$  鎖で VL 遺伝子と JL 遺伝子の近傍で DNA の切断と再結合が起こり、VL-JL 遺伝子ができる。多くの例 (2/3) で 1~96 番目のアミノ酸が VL 遺伝子由来、97~110 番目のアミノ酸が JL 遺伝子由来となる。しかし V(D)J DNA 組換え酵素 (群) は、DNA を切断後、つなぐべき末端をエキソヌクレアーゼで少し除いたのち再結合させる。その結果、VL-JL 遺伝子で

- 6 -

コードされた VL ドメインの大きさに $\pm 3$  アミノ酸程度の差異が生じる。軽鎖の CDR1 は 24-34 番目のアミノ酸に、CDR2 は 50-56 に、そして CDR3 は 89-97 番目に相当するので、その作り出す多様性の総数は $\lambda$ 鎖の場合 ( $V\lambda$  遺伝子の数)  $\times$  ( $J\lambda$  遺伝子の数)  $\times$  (ズレの総数) となる。ただし  $J\lambda$  遺伝子の場合その配列は相互に似ており、結合点のズレに関しても 67%が一定で 27%以上が $\pm 1$  であるので、実際の  $V\lambda$ - $J\lambda$  遺伝子レパートリーは大きく見積もっても 200 を越えない。 $\kappa$  遺伝子も  $\lambda$  遺伝子に状況が似ている。 $V\kappa$  遺伝子総数は 37 個、 $J\kappa$  遺伝子数は 4 個である。そこで  $V\kappa$ - $J\kappa$  遺伝子レパートリーも 200 種を越えない。

軽鎖可変領域の多様性の度合いが比較的小さいのに比べると、重鎖可変領域では大きく状況が異なる。CDR1 (31-35b 番目のアミノ酸) と CDR2 (50-65 番目のアミノ酸) については 36 個の VH 遺伝子にコードされる部分なので多様性は限られている。問題は CDR3 である。抗体の抗原結合面全体を眺めた時も、HL 両鎖の CDR 1、2 が両側に位置し、CDR3 が真ん中に位置する。重鎖の CDR1, 2, 3 が全体の 60% ぐらいを占め、軽鎖が 40% ぐらいの面積を占める。重鎖 CDR3 を除く残りの部分は軽鎖の多様性 (多くて数百種)  $\times$  重鎖 CDR1, 2 の多様性 (36) = 計約 1 万種程度のレパートリーである。重鎖 CDR3 は独立した D 遺伝子にコードされる領域だが、D 遺伝子は 26 個存在する。CDR3 をコードする領域は D-JH、VH-D という 2 回の DNA 再編成後 VH-D-JH となって完成する。

問題はこの DNA 再編成過程で、次に示すような過程が存在することである。

- (1) VH、D、JH の近傍に存在するシグナル配列真横の DNA の切断、
- (2) エキソヌクレアーゼによる DNA 末端部分切除、
- (3) 末端添加酵素によるランダム配列 (N と呼ばれる) の挿入、
- (4) DNA の修復と連結

これらの過程において、重鎖では (2) の過程のバリエーションが軽鎖に比べて大きい。更により決定的なことは、軽鎖ではみられなかった (3) の過程が存在することである。重鎖 CDR3 (アミノ酸 95-102 番目に相当) は、92 番目のシステ

インと 103 番目のトリプトファンに挟まれた領域として存在する。その長さは 5 アミノ酸から 20 アミノ酸を越えるものまで、まちまちの長さを持つことに加えて、その配列も多種多様である。このような特徴のために、CDR3 は事実上独立して分化した B 細胞毎に異なるほど多様である。

B 細胞分化途上に抗体遺伝子座で起こる重鎖の VH-D-JH、軽鎖の VL-JL DNA 再編成は、抗原の有無に関係なく起こる。1 個の B 細胞が 1 組の VH-D-JH、VL-JL 遺伝子を発現し、B 細胞全体で形造る抗体集団のことを抗体のナイーブレパートリーと呼ぶ。抗原侵入後、抗原と結合できる性質を持つ抗体を発現した細胞は増殖、分化刺激を受ける。抗体を分泌すると同時にその抗体可変領域をコードする遺伝子 (VH-D-JH、VL-JL) に高頻度に突然変異が導入される。その変異の導入によって抗原に対する結合力の高まった抗体を産生する細胞が生き残り、優れた性能の抗体を分泌し続けると同時に記憶細胞として残る。これが「抗体の成熟」である。ここで重要なことは突然変異の役割である。もともと抗体ナイーブレパートリーの中に存在しなかった抗原特異性が、突然変異の導入で生まれることはない。したがって *in vitro* で抗体をライブラリー化する場合に、生体内における抗体産生過程を再現するのであれば、ナイーブレパートリーに存在しない抗原特異性を持つクローンを排除する機構が必要である。

以下に、*in vitro* で抗体ライブラリーを作製する上での問題点を示す。

(1) 個々の抗体遺伝子は、たとえば大腸菌中で大量に発現され、フォールディングし、重鎖可変領域と軽鎖可変領域ドメインが会合して抗体分子となる。これらの段階のいずれかが正しく起こらなかったクローンは、イムノグロブリンとしての正常な構造を再現することができないので意味を持たない。

(2) *in vivo* では個々の細胞中で重鎖可変領域と軽鎖可変領域がペアをつくって 1 つの抗原特異性を示すが、*in vitro* でライブラリー化する場合には重鎖可変領域集団と軽鎖可変領域集団を別個にライブラリー化した後に組み合わせざるを得ない。たとえば 1 万種からなる B 細胞のレパートリーは、理論的には重鎖可



変領域 1 万×軽鎖可変領域 1 万＝合計 1 億種のライブラリーでやっとその全てをカバーすることが可能となる。しかし単純に組み合わせの数を増やすだけでは、ライブラリーの規模を大きくする一方で、ライブラリーに占める抗体としての活性を持たないクローンの割合も増加する。

(3) 抗体遺伝子のソースとしてヒト血液を用いると、各人の免疫学的経歴によって発現されている抗体遺伝子に大きな偏りがあるはずである。

以上の 3 つの問題点は、いずれもライブラリーのレパートリーに偏りを与える原因となる。つまり、ライブラリーを構成する理論的なクローン数に比べて、現実のライブラリーに含まれる機能的なファージ抗体の種類が著しく少ないというギャップを生じることになる。

より具体的には、特定の抗原に対して免疫応答が亢進しているために、使用頻度に於いて非常に偏りのあるクローンからなるライブラリーが考えられる。あるいは、十分な抗原結合力を持たない抗体をコードする多数のクローンを含む抗体ライブラリー等も生成されるであろう。たとえば軽鎖可変領域遺伝子と重鎖可変領域遺伝子の、それぞれ 50 % が抗体として活性な分子を発現できるとすると、両者の組み合わせによって活性な抗体が構成される割合はわずかに 25 % である。

このようなライブラリーの問題点は、実際のレパートリーサイズが理論的なサイズよりも遙かに小さいことに留まらない。たとえば、スクリーニングにおいては抗原結合力の弱い抗体分子は、免疫反応を妨害する。すなわち、抗体－抗原複合体形成は平衡反応であるために、多数のクローンと少数のクローンが混在すると、その抗原結合力の差を越えて多数派が少数派を駆逐することになる。

また不活性な抗体をコードするクローンは、クローニングにおいても障害となる。つまり、不活性な抗体をコードするクローンが多ければ、その中には増殖速度が特に速いクローンが生じる可能性も高まる。増殖速度に優れるクローンは、スクリーニング過程で選択的に選ばれてしまうので、非常に高いバックグラウンドとなる。

今までに報告されたライブラリーの問題点は、ライブラリーを構成するクローンの中で、実際にどれだけのクローンが有効であるのかを解析できる形で作製されていないことにある。したがって、ライブラリーやスクリーニングの効率についての評価ができない。

### 発明の開示

本発明の課題は、機能的なコンフォーメーションを保持した抗体分子を高い割合で含む抗体ライブラリーを提供することである。本発明は、このような抗体ライブラリーと、その製造方法、ならびにそのライブラリーを使った抗体のスクリーニング方法の提供を課題とする。また本発明は、機能的なコンフォーメーションを保持しうる抗体分子を与えるイムノグロブリンの軽鎖をコードする遺伝子を単離する方法の提供を課題としている。

本発明者らは、公知の抗体レパートリーから必要な抗体をスクリーニングすることを妨げている要因について研究を重ねた。そして、現在までに知られている抗体ライブラリーにおいては、そのレパートリーに占める、機能的なコンフォーメーションを保持した抗体分子の割合が少ないことが、有用な抗体の単離を妨げているのではないかと考えた。公知の抗体ライブラリーの製造方法においては、生体内に保持されている抗体レパートリーを忠実に *in vitro* で構成することを目標として様々な工夫が提案された。

ある場合には、多様性を高めるために人為的な変異をランダムに挿入する方法さえ試みられた。しかし、こういった試みの多くは、機能的なコンフォーメーションを維持した抗体分子を生成する一方で、明らかに抗体としての活性が不十分な抗体分子の生成も伴っていた。その結果、得られた抗体ライブラリーには、生体内では用いられることのないレパートリーや、多くの不活性な抗体分子が含まれ、機能的な抗体のスクリーニングを妨げる原因となってしまう。たとえば軽鎖可変領域遺伝子を  $10^5$  個の独立したクローンとし、これに  $10^9$  個の重鎖可変

- 10 -

領域遺伝子を組み合わせてライブラリーを構成したとする。数の上では重鎖可変領域遺伝子は十分な多様性を与えたことになるが、軽鎖可変領域遺伝子に不活性ものが多く含まれているとすると、重鎖可変領域遺伝子の一部はイムノグロブリンとしての活性を得ることができずスクリーニングの段階で失われしう。

生体内においては、多様な抗体分子をランダムに生成する機構とともに、抗体としての活性に優れる抗体を産生するクローンが選択的に増殖する機構が働いている。*in vitro*においても、不活性な抗体を除くステップを設けなければ、単に多様性を追求するのみでは、真に生体内の抗体レパートリーを再現することにはつながらない。

このような背景の下で、本発明者らは、抗体ライブラリーに占める機能的な抗体分子の割合を高めることによって、より効率的な抗体の単離が可能になると考えた。そのためには、公知の抗体ライブラリーにおいて不活性な抗体分子をもたらす原因を明らかにしなければならない。本発明者らは、抗体活性の維持に果たす軽鎖の役割に着目した。そして、まず、抗体分子に機能的なコンフォメーションを与えることができる軽鎖をスクリーニングする方法を確立した。

更に本発明者らは、こうして選択された軽鎖可変領域遺伝子の構造を丹念に解析することによって、限られた構造の軽鎖可変領域遺伝子のみを利用することによって、機能的なコンフォメーションを維持した抗体分子を高い割合で含む抗体ライブラリーの構築が可能となることを見出し本発明を完成した。軽鎖可変領域遺伝子の選択工程を経ることによって、抗体レパートリーを狭めてしまう可能性が心配される。しかしながら本発明者らは、本発明の選択方法によって選択された軽鎖可変領域遺伝子の構造を丹念に解析した結果、重鎖と機能的なコンフォメーションを再構成しうる軽鎖の構造は、現実には限られた範囲に収束することを見出した。機能的な抗体分子を構成する軽鎖の構造が、一定のレパートリーに集約されることを明らかにし、これをライブラリーの調製に応用した点に本発明の最大の特徴がある。すなわち本発明は、以下の工程を含んでなるイムノグロ

- 1 1 -

ブリンの遺伝子ライブラリーの調製方法と、このライブラリーに基づく rgdp ライブラリー、更にはこれらのライブラリーから特定の抗原を認識する抗体をコードする遺伝子をスクリーニングする方法に関する。また本発明は、以下に示す工程からなる、重鎖と機能的なコンフォーメーションを再構成することができる軽鎖をコードする遺伝子の選択方法を提供する。

- [1] 以下の工程を含む、イムノグロブリンの軽鎖可変領域遺伝子と重鎖可変領域遺伝子の組み合わせからなる遺伝子ライブラリーの調製方法。
  - a) 軽鎖可変領域遺伝子として、重鎖可変領域遺伝子の発現産物との機能的なコンフォーメーションの再構成が可能な軽鎖分子をコードするものを選択し、
  - b) 工程 a) によって得られる軽鎖可変領域遺伝子の集合である遺伝子のライブラリーを調製し、
  - c) 工程 b) のライブラリーに重鎖可変領域をコードする遺伝子のライブラリーを組み合わせる
- [2] 工程 c) において、VH ファミリーごとにそれぞれ独立して調製した重鎖可変領域遺伝子のライブラリーを、生体内における VH ファミリーの割合に応じて組み合わせる [1] に記載の方法。
- [3] 工程 c) における遺伝子ライブラリーの組み合わせを同一のベクター上で行う [1] に記載の方法。
- [4] 更に次の工程 d) を含む、[1] に記載の方法。
  - d) 重鎖可変領域に標識ペプチドが融合しており、この標識ペプチドを指標として重鎖を発現するクローンを選択する工程
- [5] [1] に記載の方法によって得ることができる遺伝子ライブラリー。
- [6] 少なくともイムノグロブリンの軽鎖可変領域をコードする遺伝子からなる遺伝子ライブラリーであって、イムノグロブリンの重鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成できない軽鎖可変領域をコードする遺

- 1 2 -

伝子が実質的に排除されている遺伝子ライブラリー。

〔7〕 ライブラリーが重鎖可変領域をコードする遺伝子のライブラリーを伴っている〔6〕に記載のライブラリー。

〔8〕 VHファミリーのそれぞれの重鎖可変領域遺伝子のライブラリーが、生体内の多様性を包含するのに十分なクローン数を有する〔7〕に記載のライブラリー。

〔9〕 ライブラリーを構成する遺伝子が、細菌、酵母、および植物細胞からなる群から選択されるいずれかの宿主細胞に導入されたものである〔6〕に記載のライブラリー。

〔10〕 ライブラリーを構成する遺伝子が、哺乳動物細胞に導入されたものである〔6〕に記載のライブラリー。

〔11〕 ライブラリーを構成する少なくとも一部の遺伝子が、繊維状ファージに組み込まれている〔6〕に記載のライブラリー。

〔12〕 ライブラリーを構成する遺伝子によってコードされる重鎖可変領域と軽鎖可変領域の断片を繊維状ファージ表面に発現し、かつそれらが機能的に再構成されている〔11〕に記載のライブラリー。

〔13〕 重鎖可変領域に標識ペプチドをコードする遺伝子が融合されている〔12〕に記載のライブラリー。

〔14〕 イムノグロブリン軽鎖可変領域遺伝子がヒトに由来するものである〔6〕に記載のライブラリー。

〔15〕 イムノグロブリン軽鎖超可変部位がシステイン残基を含まないアミノ酸配列からなる〔14〕に記載のライブラリー。

〔16〕 〔5〕に記載の遺伝子ライブラリーを構成する各クローンが、そのクローンによって保持される遺伝子によってコードされる抗体タンパク質を伴っている rgdp ライブラリー。

〔17〕 〔5〕に記載の遺伝子ライブラリーを構成する各クローンについて、

- 13 -

そのクローンによって保持される遺伝子によってコードされる抗体タンパク質から構成される抗体ライブラリー。

〔18〕 次の工程を含む、重鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成することができる軽鎖可変領域をコードする遺伝子の選択方法。

- a) 軽鎖可変領域をコードする、1つまたは複数の遺伝子を取得する工程、
- b) 軽鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを構成することが確認されているイムノグロブリン重鎖可変領域をコードする遺伝子を取得する工程、
- c) 工程 a) によって得られた軽鎖可変領域をコードする遺伝子の任意の1つを選択し、工程 b) で取得した重鎖可変領域をコードする遺伝子とイムノグロブリンの機能的なコンフォーメーションを再構成が可能な条件下でタンパク質に翻訳する工程、
- d) 工程 c) において翻訳されたタンパク質の抗原結合領域の形成を検出する工程、および
- e) 抗原結合領域の形成が検出されたタンパク質を構成する軽鎖可変領域をコードする遺伝子を選択する工程

〔19〕 更に、次の工程 f) を含む〔18〕に記載の方法。

- f) 軽鎖可変領域遺伝子の塩基配列を決定し、その塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を比較して同一のアミノ酸配列をコードする遺伝子、およびアミノ酸の欠損を生じている遺伝子を排除する工程

〔20〕 イムノグロブリンの軽鎖可変領域が、繊維状ファージの表面に発現している〔18〕に記載の方法。

〔21〕 イムノグロブリンの軽鎖可変領域をコードする遺伝子と重鎖可変領域をコードする遺伝子が挿入されたファージミドを感染させた宿主微生物の培養上清そのものを、工程 c) のための軽鎖を含む試料として利用する〔18〕に記載の方法。

〔22〕 次の工程を含む、特定の抗原と結合するイムノグロブリン可変領域

- 1 4 -

の検出方法。

a) [5] または [7] に記載のライブラリー、またはその発現産物と、該抗原とを抗原抗体反応に適した条件下に接触させる工程

b) 該抗原とイムノグロブリン可変領域との結合を検出する工程

[23] ライブラリーが [12] に記載のライブラリーである [22] に記載の方法。

[24] [22] に記載の方法の後、更に次の工程 c) を行うことを特徴とする、特定の抗原と結合するイムノグロブリン可変領域の取得方法。

c) 前記抗原と結合するイムノグロブリン可変領域を発現するクローンを選択する工程

[25] 更に次の工程 d) - e) を含む [24] に記載の方法。

d) 工程 c) で選択したファージクローンを増幅して2次的なライブラリーを得る工程、

e) 工程 c) において選択されるクローンの回収率が上昇するまで、2次的なライブラリーについて、工程 a) - d) を繰り返す工程

[26] [24] に記載の方法によって得られたクローン、またはイムノグロブリン断片、もしくはそれをコードする遺伝子。

[27] 配列番号：61～配列番号：78のいずれかに記載の塩基配列を含む、ポリヌクレオチド。

[28] 配列番号：79～配列番号：96のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む蛋白質。

[29] 次の要素からなる抗体ライブラリーの調製用キット。

a) 重鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成することができない軽鎖可変領域をコードする遺伝子を実質的に排除した軽鎖可変領域遺伝子ライブラリー、および

b) 重鎖可変領域をコードする遺伝子を増幅することができるプライマーセ

- 15 -

ット

〔30〕 以下の工程からなる抗体ライブラリーの調製方法。

- a) ファージミドに、イムノグロブリンの少なくとも可変領域を含む領域をコードする遺伝子を組み込む工程
- b) 工程 a) で得られたファージミドを宿主微生物に感染させる工程
- c) ヘルパーファージを感染させることなく、工程 b) の宿主微生物の培養上清を回収して抗体ライブラリーとする工程

あるいは本発明は、以下の病原体を認識する抗体の取得方法に関する。

〔31〕 前記抗原が、病原体に由来する抗原である〔24〕に記載の方法。

〔32〕 〔24〕に記載の方法の後、更に次の工程 f) を行うことを特徴とする、病原体の中和活性を有する抗体の取得方法。

- f) 工程 c) で選択した抗体可変領域の病原体に対する中和活性を評価し、中和活性を有する抗体可変領域を選択する工程

〔33〕 病原体に由来する抗原が、インフルエンザウイルスHA抗原、ジフテリア菌毒素、破傷風毒素、および水痘ウイルス由来の糖蛋白質からなる群から選択されるいずれかの抗原である〔31〕に記載の方法。

〔34〕 工程 a) の前に、次の工程 a') を行う、〔31〕に記載の方法。

- a') ライブラリーを吸収用抗原と接触させ、吸収用抗原に結合する抗体をライブラリーから除去する工程；ここで吸収用抗原とは、前記抗原と同じ病原体に由来するが、吸収用抗原との反応性を有する抗体の取得を望まない抗原を意味する

〔35〕 〔12〕に記載のライブラリーの、病原体中和抗体の調製における使用。

本発明において、イムノグロブリンとは、動物種やクラスを問わず、重鎖と軽鎖とで構成される全てのイムノグロブリン分子を意味する。また、抗原との結合が可能な領域のみからなる断片や、あるいはイムノグロブリンを構成する領域が



異なる動物種からなるキメラ抗体であることもできる。哺乳動物の重鎖可変領域をコードする遺伝子は、一般に遺伝子の構造的な特徴に基づいていくつかの VH ファミリーに分類されている。たとえば、ヒトでは VH1~VH7 の 7 つのファミリーに分類されている。各ファミリーは、ファミリー内で保存性の高い塩基配列を含み、この保存性の高さを利用して各ファミリー用の PCR プライマーが提案されている。軽鎖可変領域も、重鎖と同様に構造的な特徴に基づいてファミリーに分類することができる。

重鎖可変領域をコードする遺伝子は、V(Variable)、D(Diversity)、および J(Junction) の 3 つの遺伝子群から構成される。V、D、そして J の各遺伝子群が、それぞれ複数の遺伝子からなっており、それらがランダムに組み合わせり、更に変異が加わることによって抗体の多様性が生まれる。これに対して、軽鎖可変領域を構成しているのは、V、および J の 2 つの遺伝子群である。軽鎖可変領域においても重鎖可変領域と同様に、複数の遺伝子群の組み合わせと変異によって多様性がもたらされている。

本明細書では、用語「ライブラリー」を用いる。ライブラリーは、多様なレパートリーからなる構成要素を含む集合体を意味する。遺伝子は遺伝子ライブラリーを、抗体分子は抗体ライブラリーを、あるいはファージやファージミドはファージライブラリーをそれぞれ構成する。ファージが内部に保持した抗体遺伝子を表面に発現している場合には、遺伝子ライブラリーであると同時に抗体ライブラリーでもある。ただし本明細書における用語ファージライブラリーは、ファージが抗体分子の発現を伴わない場合も含む。すなわち、ファージミドを感染させた宿主微生物や、抗体可変領域をコードする遺伝子をゲノムに保持したファージが溶原化している場合もファージライブラリーである。

更に本明細書においては、用語「rgdp ライブラリー」(replicable genetic display package library ; 複製可能な遺伝的表示パッケージのライブラリー)を用いる。rgdp ライブラリーとは、すなわち、遺伝子を保持するとともに、

その遺伝子の発現生成物を表面に提示したもので構成されるライブラリーを呼ぶ。前記ファージライブラリーが、抗体タンパク質を表面に発現している場合には、rgdp ライブラリーに含まれる。rgdp ライブラリーには、ファージライブラリーのほか、外来タンパク質をその表面に発現している形質転換細胞やリボゾームからなるライブラリーを示すことができる。

また本発明においては、用語「コンフォーメーション(conformation)」を用いる。イムノグロブリンが、重鎖と軽鎖の会合(holding)によって構成されることは既に述べた。この会合の結果として生じる重鎖と軽鎖の結合物の構造が、コンフォーメーションである。コンフォーメーションは、一般的に定常領域における-SS-結合によって成立する。このとき、常に抗原との結合活性を獲得するとは限らない。本発明において、あるイムノグロブリンが抗原との結合活性を持つとき、そのイムノグロブリンのコンフォーメーションが機能的(functional)であると言う。そして、ある軽鎖との組み合わせにおいて機能的なコンフォーメーションを与える重鎖が、他の軽鎖との組み合わせによっても機能的なコンフォーメーションを与えるとき、両者の結合を特に再構成(re-holding)と呼ぶ。再構成を構成する他の軽鎖とは、いったん別々のクローンとして単離された同一の細胞に由来する軽鎖を含む。また、本発明におけるコンフォーメーションの再構成とは、あくまでもイムノグロブリンの抗原との結合に必要な領域における再構成を意味する。したがって、定常領域の有無に関わらず、可変領域における分子構造がイムノグロブリンとして再構成されていれば、機能的なコンフォーメーションを再構成したと見なす。更に、軽鎖や重鎖をコードする遺伝子への人為的な塩基配列やファージの構成タンパク質の融合などを伴う場合であっても、可変領域における再構成が達成されている限り、本発明においては機能的なコンフォーメーションを再構成したと見なす。より具体的には、本発明における分子構造の再構成とは、たとえば重鎖可変領域と軽鎖可変領域とが異なるタンパク質として翻訳された場合には、定常領域において形成される-SS-結合によって重鎖可変領

域と軽鎖可変領域とがイムノグロブリンの可変領域を構成することと言い換えることができる。

ところで single chain Fv 抗体(scFv)のように、人工的なリンカーによって重鎖と軽鎖がはじめから結合されている抗体分子も存在する。この種の特殊な抗体においては、コンフォーメーションは-SS-結合ではなく、ペプチド結合によって構成される場合がある。したがって scFv 抗体においては、定常領域を介することなくコンフォーメーションが再構成される。

まず本発明は、機能的なイムノグロブリンを再構成することができる軽鎖をコードする遺伝子の選択と、この軽鎖可変領域遺伝子に重鎖をコードする遺伝子のライブラリーを組み合わせることによる遺伝子ライブラリーの調製方法に関する。本発明における軽鎖可変領域遺伝子の選択は、以下の工程によって行うことができる。すなわち本発明は、次の工程を含む、重鎖と機能的なコンフォーメーションを再構成することができる軽鎖をコードする遺伝子の選択方法に関する。

- a) 軽鎖可変領域をコードする、1つまたは複数の遺伝子を取得する工程、
- b) 軽鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成することが確認されているイムノグロブリン重鎖可変領域をコードする遺伝子を取得する工程、
- c) 工程 a) によって得られた軽鎖可変領域をコードする遺伝子の任意の1つを選択し、工程 b) で取得した重鎖可変領域をコードする遺伝子とイムノグロブリンの機能的なコンフォーメーションを再構成が可能な条件下でタンパク質に翻訳する工程、
- d) 工程 c) において翻訳されたタンパク質の抗原結合部位の形成を検出する工程、および
- e) 抗原結合部位の形成が検出されたタンパク質を構成する軽鎖可変領域をコードする遺伝子を選択する工程

本発明において、軽鎖可変領域あるいは重鎖可変領域とは、少なくとも抗原との結合に必要な領域を含む任意の領域とすることができる。言い換えれば、3つ

の CDR とそれを保持するフレーム (FR) で構成される領域を含む任意の領域を本発明の可変領域として用いることができる。したがって、たとえば定常領域をも含む断片であっても、抗原との結合に必要な領域を含んでおれば、本発明の可変領域として利用することができる。抗体の可変領域としてしばしば用いられる、Fab や Fab' は、もともとイムノグロブリンの酵素的な切断によって得られる断片に対して与えられた名称である。本発明においては、Fab を可変領域を特定するための用語として理解すべきではない。

本発明の軽鎖可変領域遺伝子の選択方法において、対象となる軽鎖可変領域遺伝子は、任意の抗体産生細胞より得ることができる。抗体産生細胞としては、たとえば、末梢血リンパ球や脾細胞等を挙げることができる。軽鎖可変領域遺伝子の単離には RT-PCR を利用するのが有利である。たとえばヒトの場合、VLJL 遺伝子を増幅することができるプライマーが明らかにされている (特表平 3-502801 あるいは特表平 4-500607。また、MRC 社はホームページ [「V-base」 : <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html> でプライマーを公開している)。したがって、これらのプライマーを用いて RT-PCR を行えば、工程 a) に必要な軽鎖可変領域をコードする遺伝子を得ることができる。得られた遺伝子を工程 c) に用いる。

次に工程 b) において、軽鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成することが確認されているイムノグロブリン重鎖可変領域をコードする遺伝子を取得する。このとき取得する重鎖可変領域は、工程 a) で得た軽鎖可変領域と同じ動物種に由来し、かつ軽鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成することができるものであれば、抗原結合特異性などは任意であって良い。このような重鎖可変領域をコードする遺伝子は、たとえば、抗体活性を持つことが明らかなイムノグロブリン分子をコードする遺伝子から得ることができる。工程 b) の重鎖可変領域としては、 $\kappa$  鎖および  $\lambda$  鎖との再構成が可能なものを用意するのが望ましい。このような重鎖可変領域としては、実際に軽鎖との会合効率を

- 20 -

確認して、最も効率の高い重鎖可変領域を選ぶのが望ましい。たとえば後に述べる実施例においては、重鎖に対応する各種クローンについて、軽鎖との会合効率を検討したところ、次のような構造を持つ VH3-4 が最も会合の効率が高かったことから、VH3-4（配列番号：1）を選択した。VH3-4 は、以下に示す構造を持っている。

FR1:EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD

CDR1:DYAMH

FR2:WVRQAPGKGLEWVS

CDR2:GISWNSGSIGYADSVKG

FR3:RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK

CDR3:GPSGSFDAFDI

FR4:WGQGTITVTVSS

続いて工程 c) において、工程 a) によって得られた軽鎖可変領域をコードする遺伝子の任意の 1 つと工程 b) で得た重鎖可変領域をコードする遺伝子とを、イムノグロブリンの機能的なコンフォーメーションを再構成が可能な条件下でタンパク質に翻訳する。工程 b) では、機能的なコンフォーメーションを構成する重鎖可変領域をコードする遺伝子を選択しているので、工程 c) においてはイムノグロブリン分子の可変領域としての構造を再構成しているものは、機能的なコンフォーメーションを再構成したと見なすことができる。なお、ここでいうイムノグロブリン分子とは、イムノグロブリンにおける抗原との結合に必須の部分を含む限り、あらゆる構成であることができる。したがって、定常領域の有無に関わらず、抗原結合部位を再構成しているものは、イムノグロブリン分子として再構成されたと見なすことができる。

工程 c) におけるイムノグロブリンの再構成が可能な条件下とは、-SS-結合によって重鎖可変領域と軽鎖可変領域の会合(holding)が可能となる条件を意味する。より具体的には、たとえば前述のように大腸菌のペリプラズムなど生体内

- 2 1 -

の還元環境での Fab タンパク質の発現は、イムノグロブリンの再構成が可能な条件と言える。抗体のコンフォメーション形成に必要な還元的微小環境としては、ヒトなどの哺乳動物細胞では小胞体などのオルガネラを挙げることもできる。更に、重鎖と軽鎖の可変領域が人工的なアミノ酸配列（リンカー）で結合された s cFv タイプの抗体であれば、イムノグロブリンとしての再構成に必ずしも還元的な環境を必要としない場合もある。

工程 c) における軽鎖可変領域と重鎖可変領域の発現には、外来遺伝子を表面に発現するファージを用いるのが有利である。例えば繊維状ファージは、その表面に cp3 や cp8 などのファージの構成タンパク質との融合タンパク質として外来遺伝子にコードされるタンパク質を発現する。

さて、通常ファージライブラリーのスクリーニングは、ファージを粒子として回収するステップを含む。したがって、たとえば外来遺伝子をファージミドとして感染させた場合には、ヘルパーファージを感染させることによりファージ粒子として回収される。ところが本発明者らは、cp3 との融合タンパク質として Fab 遺伝子を挿入したファージミドを感染させた大腸菌をヘルパーファージを加えないで培養すると、その培養上清中に、Fab と cp3 の融合タンパク質が分泌されることを見出した。ファージミドを感染させた大腸菌によって分泌される Fab と cp3 の融合タンパク質は、20 時間の培養後でさえ微量ではあったが、本発明による軽鎖の選択方法を実施するには十分な量であった。したがって、本発明による軽鎖可変領域遺伝子の選択方法のための試料としては、ファージミドを感染させた宿主微生物の培養上清を利用することもできる。ヘルパーファージを感染させてファージ粒子として回収する工程を不要とするこの方法は、実験操作上、きわめて簡便である。本発明の方法に基づいてファージミドを感染させた宿主微生物の培養上清をスクリーニングのための試料とするためには、宿主微生物において動作可能なプロモーターと、シグナル配列とを備えたベクターを用いる。たとえば大腸菌を宿主とする場合には、シグナル配列として pelB 配列などを挿入し

- 22 -

た繊維状ファージ用のファージミドベクターを利用することができる。

もしも軽鎖可変領域が重鎖可変領域との機能的なコンフォーメーションを再構成しうるものであれば、イムノグロブリンの可変領域が形成される。この可変領域の形成を検出することによって、選択すべき軽鎖可変領域を知ることができる。可変領域の形成は例えば、イムノアッセイの原理を利用して検出することができる。すなわち、 $\kappa$ 鎖（あるいは $\lambda$ 鎖）に対する抗体を固相化抗体としてコートしたプレートに、重鎖可変領域と軽鎖可変領域の発現生成物を含む試料を加えて、軽鎖可変領域をプレート上に捕捉する。もしも重鎖可変領域が軽鎖可変領域と会合していれば、重鎖可変領域は軽鎖可変領域とともにプレート上に捕捉されるはずである。次いで重鎖や Fab に対する標識抗体を加えれば、両者が会合できたときに限り、標識抗体がプレート上に捕捉されることになる。適当な時間インキュベーションしてプレートを洗浄し、標識抗体を検出すれば、機能的なコンフォーメーションを構成する軽鎖可変領域を検出することができる。標識抗体と固相化抗体は、逆の組合せとすることもできる。あるいは、重鎖可変領域を予めビオチン化しておき、標識アビジンによって検出することもできる。前述のとおり、ここで検出に用いる試料は、ファージミドを感染させた大腸菌の培養上清を用いることができることを我々は見出している。

こうして重鎖可変領域との会合が確認された軽鎖可変領域を、重鎖可変領域との機能的なコンフォーメーションが可能な軽鎖可変領域として選択することができる。軽鎖可変領域をコードする遺伝子がファージライブラリーとして保持されている場合には、ファージを回収することによって軽鎖可変領域の遺伝子を選択することができる。

以上に述べた過程を経て得られた軽鎖可変領域遺伝子は、重鎖可変領域との再構成が可能であるのみならず、スクリーニングに利用した発現系における発現が証明されたものとなる。たとえばファージによる発現を利用した場合には、大腸菌において十分な発現が見られるものが選択される。したがって、哺乳動物細胞

では発現するものの、大腸菌では発現量が少なくなる遺伝子をこの段階で除くことができる。このような特徴は、本発明における軽鎖可変領域遺伝子の選択方法において期待することができる新規な利点である。これに対して従来の抗体ライブラリーの作製技術においては、軽鎖の選択工程を含まないため、発現レベルが不十分な軽鎖遺伝子の混入を防ぐことはできなかった。

選択された軽鎖可変領域をコードする遺伝子は、そのまま本発明による遺伝子ライブラリーの調製に用いることができる。しかしこの段階では、選択した軽鎖可変領域遺伝子の間に重複が存在している可能性がある。したがって、好ましくは軽鎖可変領域遺伝子の構造を解析し、重複を除いた上で、遺伝子ライブラリーの調製に用いる。遺伝子の重複は、たとえば次のような方法によって除くことができる。

まず前記工程 d) の後に、あるいは先だって軽鎖可変領域遺伝子の塩基配列を決定し、その塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を推定する。推定されたアミノ酸配列を比較し、同じアミノ酸配列をコードする遺伝子は除く。この段階で更に、欠損(deletion)のチェックも行うのが望ましい。このため、塩基配列の決定を行って読みとり枠のずれているものを除いた。

なお、遺伝子の取捨選択は、実際には、類似の遺伝子をグルーピングし、各グループから代表的な配列を選択することになる。このとき、選択された遺伝子を偏りなくカバーできるように、そして VL-JL 結合点のズレに関しても天然に存在する抗体で見られる分布を損なわないように選択する。実際には、遺伝子のデータベースから実際の抗体で使用されている軽鎖可変領域遺伝子をリストアップし、結合点のズレに関して集計した結果を元に分布を決定した。表 1 に、V-J の結合点 (アミノ酸配列 91-96) にいくつかのアミノ酸を持つかについて調査した結果を示す。



- 24 -

表 1

size	group					合計	reported		
	1	2	3	4	5				
1	0	0	0	0	0	0	1	(0.2%)	
2	0	0	1	0	0	1(1.0%)	2	(0.3%)	
3	0	0	0	0	0	0	2	(0.3%)	
4	0	0	0	0	0	0	1	(0.2%)	
5	2	1	3	1	1	8(7.9%)	54	(8.5%)	
6	24	17	15	9	4	69(68.3%)	427	(67.5%)	
7	3	1	13	1	1	18(17.8%)	119	(18.8%)	
8	2	1	1	0	0	0	1	(0.2%)	
11	0	0	1	0	0	1(1.0%)	0		
計			31	20	33	11	5	101	633

group: V $\kappa$  のファミリー番号 size: 91-96 のアミノ酸の数

以上の結果を総合したところ、本発明者らの解析結果によれば、ヒトのイムノグロブリンの場合、このような選択方法に基づいて選択される代表的な軽鎖可変領域のレパートリーサイズは、 $\kappa$  鎖で 101、並びに  $\lambda$  鎖でも 99 である。

つまり、ヒトの機能的なイムノグロブリンを代表しうる軽鎖可変領域のレパートリーサイズは、せいぜい 200 にすぎないことが明らかとなったのである。なお、本発明者らが明らかにしたおよそ 100 というレパートリーサイズを、限定的に解釈すべきではない。すなわち、本発明の選択方法に基づいて、たとえばヒトの軽鎖可変領域遺伝子を選択するときに選択すべき軽鎖可変領域遺伝子の数は、必ずしも 100 になるとは限らない。あくまでも、得られたアミノ酸配列に基づいて、ここに述べた選択方法を実施することによって選択された軽鎖の遺伝子を以降の工程に用いることが重要である。

ここで、スクリーニングによって得られたファージ抗体の VL 遺伝子を分類した。結果は図 1 に示した。VL 遺伝子の使用は特定の遺伝子に偏っていることがわかる。この結果から、イムノグロブリンのコンフォーメーションを再構成する軽鎖を多く含むセットを揃えることにより、機能的なイムノグロブリンの割合の高い良質なライブラリーを作製できることが示された。

ここで、生体内における抗体の多様性を維持するには、アミノ酸配列の解析の対象をできるだけ大きく取ることが望ましい。

1 人のヒトの軽鎖を構成するゲノム遺伝子は、36 種類の V<sub>L</sub>、7 種類の J<sub>L</sub>、37 種類の V<sub>k</sub>、そして 4 種類の J<sub>k</sub> で構成される。V 遺伝子と J 遺伝子の組み合わせによって軽鎖遺伝子が作られるので、単純計算では  $36 \times 7 = 252$  と  $37 \times 4 = 148$  の和、つまり 400 種類となる。加えて、遺伝子の結合の際にその結合点のアミノ酸の数には、変異が伴う。つまり、前述のように抗体遺伝子の再構成に特有の現象により、平均  $\pm 1$  アミノ酸程度（最大で  $\pm 5$  アミノ酸程度）の多様性が生まれる。この組み合わせから更に不要な遺伝子は削除されて、個人の抗体遺伝子のレパートリーとなる。さらに、個人によって遺伝子は少しずつ異なっている（これを多型;polymorphism という）。全人類が持っている抗体遺伝子の種類を調べ尽くすことは現実的ではないが、総計して 1000 種類程度であると推定される。これらのことから、1 人のヒトがあらゆる抗原に対応する抗体のセットを作ることができるのであれば、理論的には好ましくは 400 種類以上 1000 種類程度までのアミノ酸配列について本発明による解析方法を実施することによって、軽鎖可変領域遺伝子のレパートリーを十分に再現することができることになる。

本発明者らがヒトにおいて明らかにしたこのような軽鎖のレパートリーサイズ（200 種類）は、約 1000 種類のアミノ酸配列の解析の結果得られた数字である。したがって、理論的には、あらゆる抗体セットにおいて機能的なコンフォーメーションを再構成することができる軽鎖可変領域が選択されていると言うことができる。実験的にも、本発明による 200 種類と言う軽鎖可変領域遺伝子の

- 26 -

レパートリーサイズは、生体内における抗体の多様性を *in vitro* で再現するのに十分有効であることを示すことができた。しかし、より多くの塩基配列を決定し、そのアミノ酸配列についても解析を行えば、レパートリーサイズが大きくなる可能性は否定できない。

そこで、本発明によって選択された軽鎖可変領域ライブラリーのレパートリーサイズを、軽鎖遺伝子ライブラリーとの混合によって補うことができる。すなわち、軽鎖可変領域についても重鎖と同じく選択をかけない全ての軽鎖遺伝子（VL ライブラリーと呼ぶ）を用いてライブラリーを作製するのである。こうして作製した VL ライブラリーを 200 種の軽鎖可変領域のみを用いたライブラリー

（KL200 ライブラリーと呼ぶ）と混合することによって、相補的に欠点を補うライブラリーとすることができる。各ライブラリーは以下に述べる特徴を持つ。

KL200 ライブラリーは、重鎖とのコンフォメーション形成が確認されている。ただし数を限定したために、特定の特異性を持つクローンを形成するのに必要な軽鎖が除外されている可能性も否定できない。

VL ライブラリーは、独立クローン数が  $10^9$  に達しているため必要なクローンはもらしていない。しかし発現と重鎖とのコンフォメーション形成率は KL200 ライブラリーに比較して低い。

なお、本発明において、アミノ酸配列の解析結果に基づいて分類した各グループから、いずれの遺伝子を選択するかは本来任意である。したがって、重鎖との機能的なコンフォメーションの再構成が可能な軽鎖をコードする遺伝子の構造をここに明らかにすることには大きな意味はない。重要なのは、このような選択方法によって、重鎖とともに機能的なコンフォメーションを再構成することができる軽鎖の選択工程を実施することである。いずれにせよ、このような操作を通じて、ヒトであれば、101 種類の  $\kappa$  鎖遺伝子ライブラリーと、99 種類の  $\lambda$  鎖遺伝子ライブラリーからなる軽鎖可変領域遺伝子ライブラリーが得られることになる。

さて、本発明において選択された軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリーは、後に述べるように重鎖可変領域をコードする遺伝子を組み合わせることによってイムノグロブリンの遺伝子ライブラリーを与える。したがって、本発明によって選択された軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリーは、イムノグロブリンの遺伝子ライブラリー調製用のライブラリーとして有用である。すなわち本発明は、少なくともイムノグロブリンの軽鎖可変領域をコードする遺伝子からなる遺伝子ライブラリーであって、イムノグロブリンの重鎖と機能的なコンフォーメーションを再構成できない軽鎖可変領域をコードする遺伝子が実質的に排除されている遺伝子ライブラリーに関する。

本発明において、イムノグロブリンの重鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成できない軽鎖可変領域をコードする遺伝子とは、先に述べた軽鎖可変領域の選択方法によって排除することができる。重鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成できない軽鎖可変領域をコードする遺伝子を、本発明においては defective 遺伝子と呼ぶ。本発明において defective 遺伝子が実質的に排除されたライブラリーとは、defective 遺伝子の完全な排除までも要求するものではない。たとえば defective 遺伝子が混入したライブラリーであっても、免疫学的な反応に基づく抗体のスクリーニングを妨げない範囲であれば、defective 遺伝子が実質的に排除されたライブラリーと言うことができる。

抗体のスクリーニングを妨げない範囲とは、ライブラリーに占める defective 遺伝子の割合が、たとえば 0-50%、望ましくは 0-25%であることを意味する。defective 遺伝子の割合は低いほどスクリーニングの効率が高まり、有用なクローンをスクリーニングの過程で失う危険性が低くなることは言うまでも無い。しかし発明者らが試作したライブラリーにおいて、defective な遺伝子を 50%含むと考えられる VL ライブラリーを defective な遺伝子を完璧に排除した K L200 ライブラリーに様々な割合で混合したところ、50%までの混合では有効なスクリーニングができることを確認している。この事実により、defective な遺

伝子の割合がより好ましくは25%以下であれば、defective 遺伝子が実質的に排除されているとすることができる。

本発明による軽鎖のみからなるライブラリーは、重鎖の可変領域をコードする遺伝子ライブラリーを組み合わせるための材料として有用である。このようなライブラリーとしては、たとえばファージの cp3 をコードする遺伝子に defective 遺伝子が実質的に排除された軽鎖ライブラリーを組み込むとともに、重鎖の可変領域を挿入するためのクローニングサイトを設けたファージライブラリーを挙げることができる。一般にファージライブラリーは、ファージの宿主微生物に対する感染性を損なうことがないように、ファージミド上に外来遺伝子を保持させ、これをヘルパーファージを用いてファージ化する方法が用いられる。本発明のファージライブラリーも、ファージミド上に構築することができる。すなわち、宿主において機能するプロモーターの制御下に、シグナル配列と連結した前記軽鎖可変領域をコードする遺伝子と、重鎖可変領域をコードする遺伝子のクローニングサイトを設ける。重鎖可変領域遺伝子のためのクローニングサイトは、目的とする遺伝子に見出される頻度の低い制限酵素とするのが有利である。本発明によるファージライブラリーは、ファージミドのみならずファージのゲノムを利用することもできる。クローニングサイトを付加したプライマーによって重鎖可変領域遺伝子を PCR によって合成し、ファージライブラリーに挿入すればイムノグロブリンの可変領域を発現するファージライブラリーを完成することができる。

あるいは、defective 遺伝子が実質的に排除された軽鎖ライブラリーを大腸菌用の発現ベクターに組み込んで、大腸菌に形質転換することによって軽鎖可変領域ライブラリー分泌発現株とすることもできる。この大腸菌に、PCR によって得た重鎖可変領域を組み込んだファージを感染させれば、Fab をその表面に再構成したファージ粒子を得ることができる。重鎖可変領域遺伝子を様々な免疫履歴を持つ個体から選択することによって、目的とする抗体に合った抗体ライブラリーを得ることができる。

- 29 -

このような方法に基づいて、ファージライブラリー作成用キットを提供することができる。このキットは、defective 遺伝子が実質的に排除された軽鎖ライブラリーと、重鎖可変領域遺伝子増幅用のプライマーとからなる。使用者は、重鎖可変領域遺伝子増幅用のプライマーを用いて、目的とする抗体に合った免疫履歴を持つ遺伝子ソースから PCR 生成物を得ることができる。たとえば、がんの宿主からは、腫瘍関連抗原を認識する抗体ポピュレーションに富むライブラリーが期待できる。

こうして選択された軽鎖可変領域遺伝子を利用し、本発明によるライブラリーを調製する。すなわち本発明は、以下の工程を含む、イムノグロブリンの軽鎖可変領域遺伝子と重鎖可変領域遺伝子の組み合わせからなる遺伝子ライブラリーの調製方法に関する。

- a) 軽鎖可変領域遺伝子として、重鎖可変領域遺伝子の発現産物との機能的なコンフォーメーションの再構成が可能な軽鎖分子をコードするものを選択し、
- b) 工程 a) によって得られる軽鎖可変領域遺伝子の集合である遺伝子のライブラリーを調製し、
- c) 工程 b) のライブラリーに重鎖をコードする遺伝子のライブラリーを組み合わせる

工程 a) の軽鎖の選択工程は、先に述べたとおりである。先に得られた軽鎖をコードする遺伝子を集めて、工程 b) のライブラリーとすることができる。軽鎖可変領域遺伝子が繊維状ファージに保持されている場合には、このファージを増殖させ、回収してライブラリーとすることができる。次いで工程 c) として、前記軽鎖の遺伝子ライブラリーに重鎖の遺伝子ライブラリーを組み合わせる。重鎖可変領域遺伝子を、末梢血リンパ球や脾細胞のような抗体産生細胞より取得する方法は公知である。たとえばヒトのイムノグロブリンは、VH1～VH7 の 7 つの VH ファミリーからなる。

各ファミリーの遺伝子を増幅することができるプライマーは公知である (Cam

- 30 -

pbell, M. J., Zelenetz, A. D., Levy, S. & Levy, R. (1992). Use of family-specific primers for PCR amplification of the human heavy chain variable gene repertoire. *Mol. Immunol.*, 29, 193-203. また、MRC 社はホームページ「V-base」: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html> でプライマーを公開している)。したがって、このようなプライマーに基づいて RT-PCR を行えば、各ファミリー毎に重鎖可変領域遺伝子を増幅することができる。

増幅生成物として得られた重鎖可変領域遺伝子は、適当なベクターに挿入することによって遺伝子ライブラリーとすることができる。このとき、VH ファミリー毎に重鎖可変領域遺伝子ライブラリーを調製し、生体内における各ファミリーの構成割合に応じて混合することによって、本発明の遺伝子ライブラリーをより生体内の抗体レパートリーに近い状態にすることができる。具体的には、たとえばヒトの場合、各ポピュレーションはおよそ次のような割合で存在することが明らかにされている。生体における抗体レパートリーを模倣することによって、スクリーニングを通じて必要なクローンを失う機会を少なくすることができる。

VH1 : 25%

VH2 : 6.6%

VH3 : 40%

VH4 : 19%

VH5 : 5%

VH6 : 3.8%

VH7 : 1.2%

以下に重鎖可変領域遺伝子の取得について、より具体的に述べる。7種の VH ファミリー毎にプライマーを設定し、6個の JH 遺伝子に共通に働くプライマーと組み合わせて RT-PCR を行う。ヒトの各 VH ファミリーをファミリーごとに幅広く増幅することができるプライマーは公知である (Marks JD et al. *J. Mol.*

- 3 1 -

Biol. (1991) 222, 581-597 あるいは Campbell, M. J., Zelenetz, A. D., Levy, S. & Levy, R. (1992). Use of family-specific primers for PCR amplification of the human heavy chain variable gene repertoire. Mol. Immunol., 29, 193-203. また、MRC 社はホームページ「V-base」: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html> でプライマーを公開している)。用いたプライマーによって各ファミリーがきちんと増幅されているかどうかを確認する。すなわち、増幅された VHDJH 構造を有するバンドについて各ファミリー毎に数 10 種のクローンを得て塩基配列を決定し、どの重鎖可変領域遺伝子が増幅されているかを解析する。もしも増幅されていない遺伝子が存在する場合には更に新しくプライマーを設計し、追加する。たとえば、それまでに報告されているプライマーでは増幅することができなかった遺伝子の増幅を可能とする新たなプライマーが報告されている。

in frame で VHDJH 構造を持つクローンについては、適当なベクターに組み込んで大腸菌中での発現と軽鎖可変領域遺伝子との会合-folding-を解析する。もしどこかの段階が正しく起こらないクローンが存在すればその理由を推定し、ライブラリー全体の中でそのクローンの占める率を推定する。

個体のイムノグロブリンのポピュレーションは、免疫履歴によって影響を受けている。したがって、なるべく多数の個体の免疫的経歴を反映できるように、多様な B 細胞から重鎖可変領域遺伝子を調製するようにする。実際には、臍帯血、扁桃、末梢血、あるいは骨髄等、入手可能な重鎖可変領域遺伝子ソースの種類を増やす。

更に、免疫原（自己の抗原も含む）と一度も接触していない naive な B 細胞集団から B 細胞を調製することも重要である。なぜならば、自己の成分と反応するクローンは免疫系の成熟時に排除されるからである。自己抗原に対する抗体レパートリーをも含む遺伝子ライブラリーとするには、native な B 細胞は重要である。そして混合に際してはリンパ球数とクローン数が比例するように心がける。



- 3 2 -

最終的には $10^9$ オーダー ( $10^9 \sim 10^{10}$ ) の独立した VHDJH ライブラリーを作製する。

このような操作は、次のような意義を持つ。抗体の抗原結合面を構成するアミノ酸配列は、軽鎖 CDR1、CDR2、CDR3、重鎖 CDR1、CDR2 についてはゲノム上に存在する遺伝子によって規定されており（進化的な選別も含めて）、その多様性の総数は1万種程度である。その上に重鎖 CDR3 の極端に高い多様性が上積みされる。そこで抗体ライブラリーとしてはこの1万種の多様性はできる限り一様に偏り無い形で含んだ上で、重鎖 CDR3（これは個々人、個々のB細胞でランダムなプロセスで作られている）についてはなるべく広範囲にライブラリー化される必要がある。上記の方法はこの要求を満たしている。

以上のような解析を通じて、本発明者らは、CDR の中にシステイン残基を含む場合には、VH 遺伝子の発現が正しく起こらなかった等の知見を得た。また、作製した重鎖可変領域ライブラリーに関して、その70%以上が大腸菌中での発現と重鎖可変領域ドメインとの会合-folding-が正しく起きていることが確認できた。

あるいは免疫履歴を逆用し、重鎖可変領域遺伝子のソースを選択することによって、あるていどライブラリーを特徴付けることができる。たとえばある感染症の既往歴を持つ場合には、その病原体に対して親和性の高いイムノグロブリンを得られる可能性が高まる。あるいはがん患者の抗体産生細胞を重鎖可変領域遺伝子のソースとすることにより、腫瘍抗原を認識するイムノグロブリンを得ることもできる。

更に、VH 遺伝子に対して人為的な変異を加えることによって、ライブラリーの多様性を高めることができる。人為的な変異を与える方法としては、error-prone PCR (Winter, G. et. al., Annu. Rev. Immunol., 12, 433-455, 1994) が公知である。本発明においては、軽鎖可変領域における defective 遺伝子が実質的に排除されているため、重鎖可変領域遺伝子の多様性は、そのままライブラリーの多

- 33 -

様性として反映される。したがって、公知の error-prone PCR を適用した場合であっても、はるかに高度な多様化を達成することができる。error-prone PCR は、以下のように行うことができる。

error-prone PCR は、無作為に点突然変異を導入する方法として用いられる手法である。具体的には、PCR に使用する DNA ポリメラーゼの以下の生化学的性質を用いる。

- (1) Taq DNA polymerase は通常  $Mg^{2+}$  イオン存在下で用いられるが、 $Mn^{2+}$  イオンの存在下では塩基の取り込みに誤りを起こしやすくなる。
- (2) PCR 反応時に塩基の供給源として dATP, dCTP, dTTP, dGTP を通常は等量で混合するが、この濃度を突然変異を起こしやすいように変更する。
- (3) 上述の塩基の供給源として dITP を混合する。dITP は Taq DNA polymerase によって DNA 鎖にとりこまれると塩基イノシンを形成する。イノシンはどの塩基とも塩基対を形成しないので、PCR 反応が進行するとイノシンに相補的な塩基の部分には無作為の塩基が挿入される。

以上のような 3 つの条件の相乗的効果により、突然変異が無作為に導入される。具体的には、たとえば 7.5mM  $MgCl_2$ 、0.5mM  $MnCl_2$ 、0.2mM dATP/dGTP、1.0mM dCTP/dTTP、0.1-1.0mM dITP のような条件で反応を行う。実際には、実験の目的に合わせて更に濃度条件などを調整する。温度などの反応条件は通常の PCR と同様に設定する。

本発明の遺伝子ライブラリーの調製には、公知のベクターを用いることができる。本発明に用いることができるベクターとしては、たとえば先に調製した軽鎖可変領域遺伝子ライブラリーを保持したファージライブラリーを示すことができる。すなわち、ファージミドが保持している軽鎖可変領域遺伝子上流に重鎖可変領域遺伝子を挿入するのである (Gene 194 (1997) 35-46 Iba Y et al)。重鎖可変領域と軽鎖可変領域を同時に表面に発現するファージライブラリーを用いれば、抗原との結合を指標としてパニング法 (後述) を行うのに有利である。すな

- 3 4 -

わち、本発明の遺伝子ライブラリーをファージライブラリーとして構成することによって、rgdp ライブラリーとすることができる。本発明の遺伝子ライブラリーは、ファージのみならず、リボゾームや大腸菌鞭毛タンパク質の融合タンパク質として外来遺伝子を発現するシステムを用いることによって rgdp ライブラリーとすることもできる。

代表的な rgdp ライブラリーとして、ファージライブラリーが挙げられる。本発明の抗体ライブラリーに基づくファージライブラリーは、次のようにして得ることができる。ファージ表面に外来タンパク質を発現させるには、一般にファージミドとヘルパーファージが用いられる。例えば、pTZ19R（ファルマシア製）などのファージミドベクターが市販されている。ファージミドには、cp3 や cp8 等のファージの構成タンパク質をコードする遺伝子に、発現させたい外来タンパク質をコードする遺伝子を連結する。

ファージミドは、大腸菌などの宿主に感染させることによって増幅できる。しかしこの状態ではファージ粒子として回収することはできない。いわば、一般の遺伝子ライブラリーと同じ状態にある。ファージミドが保持する外来タンパク質を表面に提示したファージ粒子とするには、ファージミドを感染させた宿主にヘルパーファージを重感染させる。たとえばファージミドベクター pTZ19R は、ヘルパーファージ M13K07 の重感染によってファージ粒子として回収することができる。このとき利用されるファージミドの cp3 タンパク質が外来タンパク質と融合されていれば、完成するファージの表面には外来タンパク質が提示されることになる。

市販のファージミドに抗体の遺伝子のクローニングに好適な制限酵素サイトを導入しておけば、本発明による軽鎖可変領域遺伝子ライブラリーを重鎖可変領域遺伝子ライブラリーとともに組み込むことができる。ファージミドベクター pTZ19R に適当な制限酵素サイトを導入し、PCR で増幅した抗体遺伝子ライブラリーを組み込む方法が公知である (Gene 194, 35-46, 1997)。以下に述べる実施例にお

- 35 -

いては、ファージミドベクターのシグナル配列 PelB の下流に SfiI サイトと Asc I サイトを導入した。一方、軽鎖可変領域遺伝子の増幅には、同じサイトを導入したプライマーを用いる。PCR の増幅生成物を当該制限酵素で消化してこのサイトに組み込むことにより、PelB の下流に抗体可変領域遺伝子が挿入され、更にその下流に位置する cp3 との融合タンパク質をコードするファージミドベクター（図 2 の pFCAH9-E8d）とすることができる。

あるいは、重鎖可変領域遺伝子を細菌宿主発現用のベクターに挿入することもできる。この場合には、ベクターを細菌に形質転換することによって重鎖可変領域遺伝子を発現させる。得られた形質転換細胞に、更に軽鎖可変領域遺伝子を保持したファージライブラリーを感染させることにより、結果的に本発明による遺伝子ライブラリーが完成する。大腸菌の形質転換用ベクターとしては、pFK 等を示すことができる。なお細菌に形質転換するには、重鎖可変領域遺伝子を適当な分泌シグナルの下流に連結することによって、重鎖可変領域タンパク質をペリプラズムに分泌させることができる。pFK は、分泌シグナルとして pelB を備えたベクターである。

この他、動物細胞発現用のベクターに、先に調製した軽鎖可変領域遺伝子ライブラリーと、重鎖可変領域遺伝子ライブラリーを挿入することによって、本発明のライブラリーを調製することもできる。このようなベクターとしては pcDNAI 等を示すことができる。

本発明の遺伝子ライブラリーを構成する重鎖可変領域遺伝子は、その 3' 末端に予め標識ペプチドをコードする塩基配列を融合しておくことができる。標識ペプチドとしては、たとえばヒスチジンタグ (His x 6)、myc-tag、あるいは HA-tag 等を示すことができる。ヒスチジンタグは金属イオンとの結合活性を持つタグである。本発明のライブラリーを構成する重鎖にヒスチジンタグを融合させておくことにより、たとえば重鎖が発現しているファージをニッケルカラムに捕捉することができる。ニッケルカラムに結合できなかったファージやヘルパーファ

- 36 -

ージをニッケルカラムから洗い去ることにより、重鎖が発現しているクローンを濃縮、および精製することができる。

本発明の遺伝子ライブラリーは、様々な形態の抗体ライブラリーとすることもできる。具体的には、ファージライブラリー、大腸菌ライブラリー、あるいはリボゾームライブラリー等を示すことができる。本発明による抗体ライブラリーは、本発明によるライブラリーを構成するクローンが保持しているイムノグロブリン遺伝子を発現させ、発現生成物を回収することによって得ることができる。本発明者らは、軽鎖可変領域遺伝子と重鎖可変領域遺伝子を cp3 に融合させたファージミドを感染させた大腸菌を、ヘルパーファージを加えないで長期間培養すると Fab-cp3 融合タンパクが菌上清に分泌されることを発見した。この現象を利用することによって、ファージミドが有する抗体遺伝子の特性を容易に試験することができる。更に各クローンについて、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とが再構成されているかどうかを確認し、再構成に失敗しているクローンを排除することができる。この操作を行うことによって、本発明の抗体ライブラリーをより生体内のポピュレーションに近づけることができる。

本発明の抗体ライブラリーは、抗体のスクリーニングを通じて必要な可変領域遺伝子のスクリーニングを行うために用いることができる。本発明の抗体ライブラリーを利用することによって、可変領域遺伝子のライブラリーを手元に置き、抗体ライブラリーのみを供給して必要な抗体のスクリーニングを第三者に実施させることもできる。本発明は、本発明のライブラリーから、目的とする反応性を有する抗体を検出する方法に関する。抗体の反応性は、抗原との結合活性によって評価することができる。すなわち、次の工程によって目的とする抗原との結合活性を指標として、必要な抗体を検出することができる。

- a) 本発明の抗体ライブラリーと、該抗原とを抗原抗体反応に適した条件下に接触させる工程
- b) 該抗原とイムノグロブリン可変領域との結合を検出する工程

- 37 -

更に本発明は、本発明のライブラリーを用いる、特定の抗原を結合するイムノグロブリン可変領域の取得方法に関する。まず本発明の抗体可変領域の検出方法は、以下の工程を含む。

また本発明による、特定の抗原と結合するイムノグロブリン可変領域の取得方法は、前記工程 a) および b) に加えて次の工程 c) を含む。

c) 前記抗原と結合するイムノグロブリン可変領域を発現するクローンを選択する工程

工程 a) で用いるライブラリーには、軽鎖可変領域と重鎖可変領域の両方を発現可能なライブラリー、あるいはこのライブラリーの発現生成物からなる抗体ライブラリーを用いる。特に有用なライブラリーは、繊維状ファージ表面にライブラリーを構成する遺伝子によってコードされる重鎖と軽鎖の断片を発現し、かつそれらがファージ粒子表面上で機能的に再構成しているライブラリーである。このようなファージライブラリーは、rgdp ライブラリーとして機能し、パニング法によって容易に必要な反応性を持つクローンを濃縮することができる。本発明に基づくパニング法は、次のように実施される。

まず、目的とする抗原に rgdp ライブラリーを接触させ、この抗原に結合するクローンを回収する。回収したクローンを増幅し、再び目的の抗原と接触させて、結合するクローンを回収する工程を繰り返す。クローンの増幅は、ファージを大腸菌に感染させ、回収することによって行われる。この工程を繰り返すことによって、目的とする反応性を持つ可変領域が濃縮される。抗原との結合性に基づくスクリーニングは、一般にクローンの回収率が増加するまで行われる。ここで回収率とは、抗原に対してチャージしたクローンに数に対する、抗原への結合性を有するものとして回収されたクローンの数の割合である。回収率がその前のスクリーニングに比較して明らかに増加するとき、目的とする反応性を持つ抗体を提示したファージが濃縮されつつあることを意味する。

この他、ライブラリーを構成するクローンの発現生成物をクローン毎に回収し

た抗体ライブラリーに基づくスクリーニングを行うこともできる。各クローンの発現生成物を目的とする抗原に接触させることによって、必要な反応性を持つイムノグロブリンを直接選り出すこともできる。抗原との結合が観察されたイムノグロブリンをコードするクローンを選択すれば、目的とする可変領域を得ることができる。

本発明においては、抗体可変領域の検出や取得に用いる抗原として、抗原決定基を有するあらゆる化合物を用いることができる。幅広い蛋白質、糖、核酸、有機化合物、あるいは無機化合物が、抗原決定基を有することが知られている。これらの化合物は、生体に由来するものであっても良いし、人工的に合成されたものであってもよい。具体的には、動植物、細菌や真菌等の微生物、あるいはウイルス等の細胞や粒子、これらを構成する蛋白質、糖鎖、あるいは脂質等が抗原として用いられる。その他、非蛋白質性の、各種の薬物、ホルモン、ビタミン、サイトカイン、ケモカイン、環境汚染の原因となる化学物質等も、抗原決定基を有するものであれば、本発明に用いることができる。

また、目的とする抗体が結合すべき抗原分子の全体を用いることもできるし、あるいは抗原分子の一部を用いることもできる。特に断らない限り、本発明における抗原は、その抗原の部分的な構造を保持した化合物を含む。たとえば、抗原分子の一部として、その抗原分子に固有の構造からなる抗原決定基を含む領域を用いることにより、特異性に優れた抗体を取得することができる。

更に、複数の分子が結合した複合体を抗原とすることもできる。特に断らない限り、本発明における抗原は、複数の分子からなる複合体を含む。複合体を抗原とすることにより、単独の分子と複合体とを識別することができる抗体を取得することができる。

本発明のライブラリーから、たとえば病原体に対する中和抗体として有用な抗体分子を検出し、それをコードする遺伝子を取得することができる。本発明において病原体とは、病原性を有するあらゆる生命体、あるいは生命体に由来する物

質を含む。より具体的には、ウイルス、細菌、真菌、マイコプラズマ、あるいは多細胞の寄生性生命体などを示すことができる。また微生物や動植物に由来する毒素も、本発明の病原体に含まれる。したがって、コレラ菌や腸管出血性大腸菌等が産生する毒素は、本発明の病原体に含まれる。あるいは、蛇毒や蜂毒などの生物毒素もまた本発明の病原体に含まれる。他方、本発明の中和抗体とは、病原体の、病原性や感染性を抑制する働きを有する抗体を言う。

本発明による中和抗体の検出方法は、病原体に由来する抗原に本発明のライブラリーを接触させ、この抗原に結合するイムノグロブリン可変領域を発現するクローンを検出する。更に本発明は、抗原に結合する可変領域を発現するクローンを選択することにより、中和抗体をスクリーニングする方法を提供する。

本発明による中和抗体のスクリーニング方法においては、目的としない反応性を有する抗体可変領域を抗体ライブラリーから吸収することができる。たとえば、インフルエンザウイルスの HA 抗原に対する抗体は、その感染性の抑制に有効とされている。一方、同じインフルエンザウイルス粒子に対する抗体であっても、核蛋白質 (NP) に対する抗体は、ウイルスを中和する活性はない。しかし、インフルエンザウイルス粒子を抗原として用いると、しばしば NP に対する抗体も検出されるため、結果として中和抗体のスクリーニング効率を低下させる原因となってしまう。このようなときには、あらかじめ抗 NP 抗体を吸収しておくことにより、抗 HA 抗体を効率的に検出することができる。抗 NP 抗体は、本発明のライブラリーをインフルエンザウイルス粒子の NP 抗原と抗原抗体反応が可能な条件下で接触させ、NP 抗原に結合した抗体可変領域を除去することにより、吸収することができる。HA 抗原に対する抗体を効率的に取得するためには、たとえば NP 抗原を含まない、精製 HA 抗原との結合活性を指標とすることも可能である。しかし、予め抗 NP 抗体を吸収する工程を利用する方法は、表面構造を維持したウイルス粒子に対する抗体の反応性を確認できる点で有利である。

このようにして得られたイムノグロブリン可変領域をコードする遺伝子、並び



- 40 -

にその発現産物であるイムノグロブリン可変領域は本発明に含まれる。得られたイムノグロブリン可変領域は、診断や治療に有用である。特に、ヒトのイムノグロブリンである場合には、ヒトへの投与が可能である。具体的には、各種感染症、腫瘍、あるいは動脈硬化等の診断や治療に利用することができる。イムノグロブリンを用いた、診断や治療については様々なバリエーションが公知である。

本発明によって得られたイムノグロブリン可変領域を完全なヒト・イムノグロブリン分子ととすることによって、単なる親和性リガンドとしてではなく、抗体分子として用いることができる。すなわち、本発明によって得られた重鎖可変領域、ならびに軽鎖可変領域遺伝子を、定常領域をコードする遺伝子 CH、および CL と接合する。定常領域をコードする遺伝子として、IgG に由来するものを用いることにより、オプソニン作用に優れるイムノグロブリンとすることができる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明によって得られたファージ抗体の VL 遺伝子を分類した結果を示すグラフ。

グラフの横軸：軽鎖の Germline (染色体) 可変領域遺伝子 63 種類。

グラフの縦軸：ファージ抗体スクリーニング時の抗原  
奥から、

1. 破傷風毒素 (TET)
2. インフルエンザウイルス抗原 (IFL)
3. 水痘帯状疱疹ウイルス抗原 (VZGH)
4. ジフテリア毒素 (DTD)
5. 6+7 の合計 (total)
6. 感作抗原合計 (1+2+3+4) (imunized)

- 41 -

7. 非感作抗原合計 (*C. elegans* など人間が一生出会わないと考えられる抗原)  
(no immunized)

グラフの高さ：ファージ抗体の数。

図2は、本発明による可変領域ライブラリーの作製に用いた各種のベクターの構造を模式的に示す図。

- 1) pAALFab : D1.3 mutation 用ベクター。
- 2) pFCAH3-E8T : E8 発現用ベクター。pAALFab をもとに、制限酵素サイトを改変した。新たに PstI、XbaI、および KpnI サイトを付加し、EcoRI、および XhoI サイトの位置を変更した。
- 3) pFvCA-E8VHd : 重鎖可変領域遺伝子クローニング用ベクター。pFCAH3-E8T をもとに、制限酵素サイトを改変した。XbaI-EcoRI 間を欠落させ、新たに KpnI、SfiI、NcoI、および SpeI サイトを付加した。重鎖可変領域遺伝子を SfiI-XhoI サイトにクローニング可能。
- 4) pFCAH9-E8d : 重鎖可変領域遺伝子クローニング用ベクター。pFCAH3-E8T、および pFvCA-E8VHd をもとに DNA 配列を改変した。マウス  $\gamma$  CH1 をヒト  $\gamma$  CH1 で置きかえた。新たに、SfiI、NcoI、および AscI サイトを付加した。軽鎖可変領域を SfiI-AscI サイトにクローニング可能。

図3は、pFCAH9-E8d のインサートの塩基配列を示す図。

図4は、pFCAH9-E8d のインサートの制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を示す図 (1)。

図5は、pFCAH9-E8d のインサートの制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を示す図 (2)。

図6は、pFCAH9-E8d のインサートの制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を示す図 (3)。

図7は、pscFvCA-E8VHd のインサートの塩基配列を示す図。

図8は、pscFvCA-E8VHd のインサートの制限酵素サイトと塩基配列によってコ

- 42 -

ードされるアミノ酸配列を示す図（１）。

図 9 は、pscFvCA-E8VHd のインサートの制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を示す図（２）。

図 10 は、本発明による抗体ライブラリーから選択された抗体のアフィニティーの測定結果を示すグラフ。縦軸は 492nm における吸光度を、横軸はクローンの番号を示す。横軸の PC は陽性コントロールを示す。

図 11 は、表 15 の各クローンの ELISA における gH あるいは gE に対する反応性を示すグラフ。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

#### 1. ライブラリー作製用ファージミドベクターの作製

##### 1-1 重鎖および軽鎖の組合せライブラリーを作製するためのベクターの作製。

図 2 に概念的に示すように、pTZ19R ファージミドベクター（ファルマシア）に M13 ファージの pelB（シグナル配列）、His6 タグ配列、M13 ファージの cp3 タンパク質（ $\Delta$ cp3（198aa-406aa）N 端欠失キャプシドタンパク質 3）配列、および proteinA のアミノ酸配列をコードする DNA を適当な制限酵素部位で組み込みベクター pFCAH9-E8d を作成した（GENE 194(1997)35-46 Iba Y et al 参照）。軽鎖  $\lambda$ 5,  $\lambda$ 6 遺伝子に存在する BstPI でその遺伝子が切断されることを避けるために pFCAH9-E8d は XhoI 部位が設けられている。pFCAH9-E8d のインサートの塩基配列を図 3 に、制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を図 4～図 6 に示した。

このベクターの所定の位置に重鎖と軽鎖の遺伝子を挿入することにより、実際の抗体タンパク質発現ベクターが完成することとなる。完成したベクターによって発現される抗体の形状は Fab 型であり、重鎖軽鎖は N 末の可変領域に続いて定常領域 CH1, CL をそれぞれ有している。定常領域同士の-SS-結合によって、

- 43 -

重鎖と軽鎖は結合されることになる。軽鎖定常領域 CL 遺伝子は前述の cp3 遺伝子と結合されており、結果として発現タンパク質は Fab-cp3 の形状となる。

具体的には、以下のような操作を行った。

用いたプライマー：

527 Reverse (配列番号：2)：

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

599 E8VHf-PstR：(配列番号：3)

3'-CGGCTCCAAGTCGACGTCGTCA-5'

544 E8VHf-PstF：(配列番号：4)

5'-CAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAA-3'

545 E8VHf-XbaR：(配列番号：5)

3'-AGACCGAAGTTGTAATTTCTGTGGATATACGTGACCCACTTCGTCTCCGGACTTTTCCCAGATCTCACCTAACCTTCCTAA-5'

546 E8VHf-XbaF：(配列番号：6)

5'-AAGGGTCTAGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAGTGGTAATACTAAATATGACCCGAAGGACAAGGCCACTATAACAGCA-3'

547 E8VHf-EcoR (配列番号：7)

3'-TTCCTGTTCCGGTGATATTGTCGTCTGTGTAGGAGGTTGTGTCGGATGGATGTCGACTTAAGGGAC-5'

548 E8VHf-EcoF (配列番号：8)

5'-CAGCTGAATTCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGT-3'

549 E8VHf-BstR (配列番号：9)：

3'-CAGATAATGACACGACCAATACTAATGCCGTTGAACTGATGACCCCGTTCCGTGGTGCCAGTGCCACAAGG-5'

590 His6-SmaR (配列番号：10)：

- 4 4 -

3' -GGTTCTCTAACAGTAGTGGTAGTAGTGGTAATTATTCTCGATAGGGCCCTCGAA-5'

542 E8VLf-SacF (配列番号 : 1 1) :

5' -GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGCGTCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACAT  
GT-3'

539 E8VLf-KpnR (配列番号 : 1 2) :

3' -TGACAGTGGTAGTGTACAGCTCGTTCACCCTTATAAGTGTTAATAAATCGTACCATGGTCGTC-5'

542 E8VLf-KpnF (配列番号 : 1 3) :

5' -GCATGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTAT-3'

543 E8VLf-BamR (配列番号 : 1 4) :

3' -GGAGTCGAGGACCAGATATTACGTTTTTGAATCGTCTACCACACGGTAGTTCCAAGTCACCGTCAC  
CTAGGCCTTGTGTT-5'

562 E8VLf-XhoR (配列番号 : 1 5) :

3' -TCATGAGGCACCTGCAAGCCACCTCCGTGGTTCGAGCTCTAGTTT-5'

563 E8VLf-XhoF (配列番号 : 1 6) :

5' -AGTACTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTCGAGATCAAA-3'

613 NheR (配列番号 : 1 7) :

3' -ATCGACAGCT-5'

600 E8VLKpnXhoR (配列番号 : 1 8) :

3' -AAGCCACCTCCATGGTTCGAGCTCTAGTTT-5'

LCP3ASC (配列番号 : 1 9) :

3' -TCGAAGTTGTCCTTACTCACAAGCCGCGCGGTCAGCTGAGGTAA-5'

hCH1Bst (配列番号 : 2 0) :

5' -ACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG-3'

hCH1midAS (配列番号 : 2 1) :

3' -GGGAGTCGTCGCAGCACTGGCACGGGAGGTCGTCGAA-5'

hCH1midS (配列番号 : 2 2) :

- 45 -

5' -GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCC-3'

hCH1H6 (配列番号 : 23) :

3' -GGGTCGTTGTGGTTCCACCTGTTCTTTCAACTCGGGTTTAGAACAGTAGTGGTAGTAGTGGTA-5'

hCH1H6Sma (配列番号 : 24) :

3' -GGGTTTAGAACAGTAGTGGTAGTAGTGGTAATTATTCTCGATAGGGCCCTCGAACG-5'

702 BstXhoF (配列番号 : 25) :

5' -GGCACCACGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACC-3'

pFCAH3-E8T 重鎖部分の作製

1) pAALFab を鋳型にして 527-599 を用いた PCR, 547-590 を用いた PCR を行い DNA 断片を作製した。

2) 544-545, 546-547, 548-549 にて PCR を行い DNA 断片を作製した

3) 1) 2) を混合し 527, 590 による PCR を行い、これを pAALFab の HindIII-SmaI site にクローニングした

pFCAH3-E8T 軽鎖部分

4) 542-562, 561-613 を用いた PCR を行い DNA 断片を作製した

5) 538-539, 542-543 にて PCR を行い DNA 断片を作製した

6) 4) 5) を混合し 538, 562 による PCR を行い、これを pAALFab の SacI-NheI site にクローニングした

pFCAH9-E8d

6) VH stuffer 部分の作製

pFCAH3-E8T を XbaI, EcoRI にて消化、klenow fragment を作用させて平滑末端に変えた後 self ligation させて VH 部分の stuffer を作製した。

7) VH stuffer 部分の作製

pFCAH3-E8T を鋳型にして 527-600 にて PCR。6) の HindIII-XhoI site にクローニングした。

8) これを KpnI にて消化、self ligation させて VL 部分の stuffer を作製

### 9) SfiI, NcoI, SpeI site の導入

pFCAH3-E8T を鋳型にして 527-663 にて PCR。 1) の HindIII-SacI site にクローニングした。

## 10) AscI site の導入

pFCAH3-E8T を鋳型にして 527-LCP3ASC にて PCR し、それを SacI 完全消化、SalI 部分消化した 2) にクローニングした。

1 1) gammaCH1 部分をヒト遺伝子に変換

ヒト gammaCH1 部分には BstPI site が存在するためこれをなくす設計でクローニングを行った。扁桃 cDNA を鋳型にして hCH1Bst-hCH1midS, hCH1midAS-hCH1H6 にて PCR したのち、これを混合して hCH1Bst-hCH16Sma にて PCR し、その DNA 断片を 3) の BstPI-Sma site にクローニングした。

## 1 2) Xho site の導入

11) を鋳型に 702-663 にて PCR を行い、これを 11) の BstPI-SacI site にクローニングした。

### 1-2 重鎖可変領域を一時的にクローニングするためのベクターの作製

公知の手法(GENE 194(1997)35-46 Iba Y et al 参照)に従って、まず pAALFab ベクター (図 2) を作製した。pAALFab ベクターの XbaI から EcoRI の間を欠落させ、新たに制限酵素切断部位 Kpn I, Sfi I, Nco I, Spe I を付加して、pFCA H3-E8T を経て、VH(重鎖可変領域)をクローニング可能としたベクター-pscFvCA-E8VHd (図 2) を作製し、重鎖可変領域を一時的にクローニングするためのベクターとした。pscFvCA-E8VHd のインサートの塩基配列を図 7 に、制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を図 8 ~ 図 9 に示した。

具体的には

610 scBstSpeSacF (配列番号 : 26) :

5'-CACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGTGGCGGATCAGGTGGCGGTGGAAGTGGCGGTGGTGGGTCT  
ACTAGTGACATCGAGCTACCCAG-3'

- 47 -

611 scBstSpeSacR (配列番号 : 27) :

3'-GTGGTGCCAGTGGCAGAGGAGTCCGCCACCGCCTAGTCCACCGCCACCTTCACCGCCACCACCCAGA  
TGATCACTGTAGCTCGAGTGGGTC-5'

527 Reverse (配列番号 : 28) :

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

619 E8VHf-SfiNcoPstR (配列番号 : 29) :

3'-GACGCCGGGTCCGCCGGTACCGGCTCCAAGTCGACGTCGTCA-5'

primer610 と primer611 をアニールさせ、それを pFCAH3-E8T の BstPI-SacI site にクローニングして single chain の作製を行なった。さらに、primer527 と primer619 にて PCR を行い、これをさらに HindIII-PstI site にクローニングし、SfiI, NcoI site へ導入した。

## 2. イムノグロブリン軽鎖ライブラリーの作製

### 2-1 PCR を用いたイムノグロブリン軽鎖遺伝子の単離

骨髄細胞 (検体 No. 59)  $4 \times 10^7$  cells、および臍帯血と末梢血のリンパ球から、市販のキット (Pharmacia Biotech 社製 QuickPrep Micro mRNA Purification Kit) を用いて、 $2.6 \mu\text{g}$  の mRNA を得た。この mRNA から cDNA を作製した。cDNA は、GibcoBRL 社製 SuperScript Preamplification System によって作製した。プライマーには、オリゴ dT を用いた。得られた cDNA を鋳型にして、軽鎖遺伝子の取得用 5' プライマー ( $\kappa 1 \sim \kappa 6$ ,  $\lambda 1 \sim \lambda 6$ ) と 3' プライマー (hCKASC プライマーまたは hCLASC プライマー) を用いて、PCR を行った。PCR 産物は、フェノール処理後、エタノール沈殿して  $10 \mu\text{l}$  の TE バッファーに懸濁した。用いたプライマーの塩基配列と PCR の条件は以下のとおりである。軽鎖遺伝子取得用プライマーの塩基配列中、下線部は SfiI サイト、AscI サイトを示す。

5'-プライマー  $\kappa 1 \sim \kappa 6$

hVK1a (配列番号 : 30) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC GACATCCAGATGACCCAGTCTCC



- 48 -

hVK2a (配列番号 : 31) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC

hVK3a (配列番号 : 32) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC

hVK4a (配列番号 : 33) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC GACATCGTGATGACCCAGTCTCC

hVK5a (配列番号 : 34) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC GAAACGACACTCACGCAGTCTCC

hVK6a (配列番号 : 35) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC

5'-プライマー $\lambda 1 \sim \lambda 6$ 

hVL1 (配列番号 : 36) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC

hVL2 (配列番号 : 37) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC

hVK3a (配列番号 : 38) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC

hVL3b (配列番号 : 39) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC

hVL4 (配列番号 : 40) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CACGTTATACTGACTCAACCGCC

hVL5 (配列番号 : 41) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGCC

hVL6 (配列番号 : 42) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA

3'-プライマーhCKASC (配列番号 : 43) :

- 49 -

TCGACTGGCGCGCCGAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTG

3'-プライマーHCLASC (配列番号: 44):

TCGACTGGCGCGCCGAACATTCTGTAGGGGCCACTGTCTTCTC

PCR の条件

cDNA	2 $\mu$ l
10 $\times$ buffer #1 (KOD に添付)	10 $\mu$ l
dNTP mix (2.0mM)	10 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ l
5' 側プライマー (100pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
3' 側プライマー (100pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
滅菌済 MilliQ	71 $\mu$ l
KOD DNA polymerase (東洋紡 2.5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

94°C 1 分、55°C 2 分、74°C 1 分を 35 サイクル

2-2 ライブラリー作製に適した軽鎖を選択して軽鎖遺伝子ライブラリーを作製する方法

2-2-1 軽鎖遺伝子のファージミドへの組込み

1 で得た PCR 産物を以下の条件で制限酵素処理した。

PCR 産物	10 $\mu$ l
10 $\times$ NEB4 (AscI に添付)	5 $\mu$ l
10 $\times$ BSA (SfiI に添付)	5 $\mu$ l
滅菌済 MilliQ	28 $\mu$ l
AscI (NEW ENGLAND Biolabs Inc. 10 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
SfiI (NEW ENGLAND Biolabs Inc. 20 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

37°C で 1 時間、50°C で 1 時間反応後、そのうち 10  $\mu$  l 分をアガロース電気泳動し、600bp 付近のバンドを切り出して、ジーンクリーン II キット (フナコシ株式会社) で精製した。PCR 産物と同様に制限酵素処理した pFCAH9-E8d (図

- 50 -

2) をジーンクリーン II キットで精製し、制限酵素処理した PCR 産物と以下の条件で 16°C で 4 時間～一晩反応させることによりライゲーションした。

制限酵素処理した pFCAH9-E8d	2 $\mu$ l
制限酵素処理した PCR 産物	1 $\mu$ l
10 $\times$ ligation buffer	1.5 $\mu$ l
(T4 DNA ligase に添付)	
10mM ATP	1.5 $\mu$ l
滅菌済 MilliQ	8 $\mu$ l
T4 DNA ligase (宝酒造 10 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

#### 2-2-2 ファージミドの大腸菌への導入

得られた ligated DNA を用いて以下のように大腸菌 DH12S を形質転換した。即ち、ligated DNA を一旦エタノール沈殿し、1/5TE (TE を滅菌済 MilliQ で 5 倍希釈したもの) 3  $\mu$  l に溶解した。そのうち、1.5  $\mu$  l をコンピテントセル DH12S (G IBCO BRL 製) 20  $\mu$  l に懸濁し、以下の条件でエレクトロポレーションを行った。

##### エレクトロポレーター

BRL 社 Cell-Porator (Cat. series 1600)

設定条件 ; voltage booster	4k $\Omega$
capacitance	330 $\mu$ F
DC volts	Low $\Omega$
charge rate	Fast

#### 2-2-3 ファージミドで形質転換した大腸菌からの Fab-cp3 型抗体培地中への分泌

形質転換した上記の大腸菌を形質転換用培地 (SOB) 2ml に植え、37°C で 1 時間振盪培養したあと、一部を寒天培地 (Amp プレート) にまき、残りは、0.1% グルコース、100  $\mu$  g/ml アンピシリン含有 2 $\times$ TY 培地で培養し、グリセリンストックした。寒天培地は 30°C で incubate し、生えてきたコロニーを楊枝でつついて

- 5 1 -

分離し、それぞれプラスミドを調製し、軽鎖遺伝子の塩基配列を調べた。

SOB 培地：950mL の精製水に次の成分を加えて振とうし、完全に溶解した後 250mM の KCl 溶液 10mL を加え、5N NaOH で pH7.0 に調製した。精製水を加えて 1000mL に調整した後、オートクレーブで 20 分間滅菌し、使用直前に滅菌した 2M の  $MgCl_2$  を 5mL 加えた。

bacto-tryptone 20g

bacto-yeast extract 5g

NaCl 0.5g

2×YT 培地：900mL の精製水に次の成分を加えて振とうし、完全に溶解した後 5N NaOH で pH を 7.0 に調製し、精製水を加えて 1000mL とした。オートクレーブで 20 分間滅菌して使用した。

bacto-tryptone 16g

bacto-yeast extract 10g

NaCl 5g

その他の試薬は以下から購入した。

メーカー	品名
シグマ	アンピシリンナトリウム
和光純薬	フェノール
シグマ	BSA
DIFCO	2×YT 培地
和光純薬	カナマイシン硫酸塩
ナカライテスク	ポリエチレングリコール 6000
ナカライテスク	Tween20
片山化学	NaCl
和光純薬	IPTG
和光純薬	スキムミルク

- 5 2 -

和光純薬            アジ化ナトリウム  
 和光純薬            トリエチルアミン  
 和光純薬            過酸化水素  
 和光純薬            O P D 錠  
 和光純薬            エタノール

$\kappa 1$ 、 $\kappa 2$ 、 $\kappa 3$ 、 $\kappa 4$ 、 $\kappa 5$ 、および $\kappa 6$ 、並びに $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3a$ 、 $\lambda 3b$ 、 $\lambda 4$ 、 $\lambda 5$ 、 $\lambda 6$ 、 $\lambda 7$ 、 $\lambda 8$ 、 $\lambda 9$ 、および $\lambda 10$ の全てについて以上の操作を行い、目的のクローンが得られているかどうか確認した。続いて $\kappa 1$ 、 $\kappa 2$ などの各グループのクローンを *in vivo* での使用頻度に近い比率になるように混合した。これら軽鎖の各グループは、それぞれ実際の生体内でどのような割合で発現しているのかが既に知られている。PCR 法で増幅してベクターに組み込んだこれらの遺伝子クローンを、*in vivo* での使用頻度に近い比率になるように混合し VL ライブラリーとした。VL ライブラリーにおける各 family の構成比率を以下に示す。

表 2

family	<i>in vivo</i> での 使用頻度(%)*	VL ライブラリー での構成比率(%)	KL200 での 構成比率(%)
V $\kappa 1$	39	37	30.7
V $\kappa 2$	12	12	19.8
V $\kappa 3$	36	35	33.7
V $\kappa 4$	12	12	10.9
V $\kappa 5$	1	2	5.0
V $\kappa 6$	***	2***	0.0

\* Griffith AD et al. EMBO J. (1994) 13, 3245-60.

\*\*発表時記載なし。

\*\*\* プライマーVK6-2 で作製した cDNA とプライマーVK6-3 で作製した cDNA を等量混合。

- 53 -

表 3

family	in vivo での 使用頻度(%)*	VL ライブラリー での構成比率(%)	KL200 での 構成比率(%)
Vλ 1	43	41	34.1
Vλ 2	15	15* <sup>3</sup>	15.2
Vλ 3	34	32* <sup>4</sup>	25.3
Vλ 4	0	1.5* <sup>5</sup>	0.0
Vλ 5	0	1.0* <sup>6</sup>	11.1
Vλ 6	0	1.0	14.1
Vλ 7	6	6	0.0
Vλ 8	1	1	0.0
Vλ 9	1	1	0.0
Vλ 10	-* <sup>2</sup>	1	0.0

\* Griffith AD et al. EMBO J. (1994) 13, 3245-60.

\*2 発表時記載なし。

\*3 プライマーVL2 で作製した cDNA5%とプライマーVL2-2 で作製した cDNA10%を混合。

\*4 プライマーVL3a-2 で作製した cDNA17%とプライマーVL3b で作製した cDNA15%を混合。

\*5 プライマーVL4a で作製した cDNA0.5%とプライマーVL4b で作製した cDNA0.5%とプライマーVL4c で作製した cDNA0.5%を混合。

\*6 プライマーVL5abde で作製した cDNA0.5%とプライマーVL5c で作製した cDNA0.5%を混合。

次に、VL ライブラリーから無作為に選んだ約 1000 個の軽鎖遺伝子の塩基配列を確認した。すなわち、蛍光プライマー huCH1J (5'-ATTAATAAGAGCTATCCCGG-3' / 配列番号: 45) を用い、サーモシークエンスキット (アマシャム・ファルマシア製) とアロカ社製 L1-COR4200L(S)-2 を使用したジデオキシ法によって塩基配列を決定した。得られた塩基配列を比較して重複するクローンを除いた。更にデータベースと照合し、deletion が無いと確認されたクローンについて、

予め発現することがわかっている重鎖遺伝子のクローンの一つ VH3-4 と組み合わせ、発現実験を行った。操作は以下のとおりである。VH3-4 のアミノ酸配列を配列番号：1 に示した。

まず VH3-4 を HindIII と XhoI で消化し、重鎖遺伝子を切り出して、ジーンクリーン II キットで精製した。一方、deletion が無いと確認された軽鎖遺伝子クローンについても HindIII と XhoI で消化し、軽鎖遺伝子を切り出して、ジーンクリーン II キットで精製し、VH3-4 の重鎖遺伝子とライゲーションすることにより、組み合わせた。得られた ligated DNA を用いて大腸菌 DH12S を形質転換した。生えてきたコロニーを試験管にいた培地にうえ、IPTG で発現を誘導することにより、Fab-cp3 型の抗体分子を培養上清中に発現させた。20 時間程度の培養により、ヘルパーファージの感染無しでも Fab-cp3 型の抗体分子が培養上清に発現される。この培養上清を用いて以下のような ELISA を行った。

#### 2-2-4 ELISA 法による重鎖と軽鎖の正しい発現と会合の検定

##### 1) 抗体結合 96well マイクロタイタープレートの作製

抗  $\kappa$  抗体 (MBL code No. 159) を 0.01M ナトリウムリン酸緩衝液 pH8.0, 0.1%  $\text{NaN}_3$  で  $1.25 \mu\text{g/ml}$  で希釈し、 $100 \mu\text{L}$  ずつマイクロタイタープレートに添加した。4°Cで一晩静置することにより、ウエルに抗  $\kappa$  抗体を吸着させた。反応液を捨て、5% BSA in 0.01M ナトリウムリン酸緩衝液 pH8.0, 0.1%  $\text{NaN}_3$  を  $200 \mu\text{L}$  ずつマイクロタイタープレートに添加し、37°Cで2時間静置することにより、非特異的な吸着を防ぐためにブロッキングした。

次に、非特異的活性吸収済の抗  $\lambda$  抗体 (MBL code No. 159) を 0.01M ナトリウムリン酸緩衝液 pH8.0, 0.1%  $\text{NaN}_3$  で  $2.5 \mu\text{g/ml}$  に希釈し、 $100 \mu\text{L}$  ずつマイクロタイタープレートに添加し氷室で一晩静置した。反応液を捨て、5% BSA in 0.01M ナトリウムリン酸緩衝液 pH8.0, 0.1%  $\text{NaN}_3$  を  $200 \mu\text{L}$  ずつマイクロタイタープレートに添加し 37°Cで2時間静置し、非特異的な結合を防ぐためにブロッキングを行った。

- 5 5 -

## 2) 1 次反応

positive control として、ヒト Fab (10  $\mu$ g/ml) を、negative control として、PBS/0.1%NaN<sub>3</sub> をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつマイクロタイタープレートに添加した。IPTG で Fab-cp3 型の抗体分子の発現を誘導した培養上清の原液を 100  $\mu$ l ずつマイクロタイタープレートに添加し 37°C で 1 時間反応させた。

## 3) 2 次反応

1 次反応を終了したマイクロタイタープレートを 0.05%Tween20-PBS で 5 回洗浄した。次いで PBS/0.1%NaN<sub>3</sub> で希釈した抗 Fd 抗体 (1  $\mu$ g/ml) を 100  $\mu$ l ずつマイクロタイタープレートに添加し 37°C で 1 時間反応させた。

## 4) 3 次反応

2 次反応を終了したマイクロタイタープレートを 0.05%Tween20-PBS で 5 回洗浄した。次いで PBS/0.1%NaN<sub>3</sub> で希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒツジ IgG 抗体 (4000 倍希釈) を 100  $\mu$ l ずつマイクロタイタープレートに添加し 37°C で 1 時間反応させた。

## 5) 発色反応および吸光度測定

3 次反応を終了したマイクロタイタープレートを 0.05%Tween20-PBS で 5 回洗浄した。次いで発色基質溶液 (SIGMA 1040 phosphatase substrate tablets 1 粒あたり 5ml の 50mM ジエタノールアミン PH9.8 に溶解したもの) を 100  $\mu$ l ずつマイクロタイタープレートに添加した。室温で反応させ、405nm の吸光度が 0.5 以上になったと思われる時点で、停止液を添加し、プレートリーダー (タイターテック マルチスキャン MCC) で吸光度測定した。

この ELISA で陽性 (吸光度 0.5 以上) となったクローンは、Fab-cp3 型の抗体分子の発現と会合がうまく行われているとし、 $\kappa$  鎖遺伝子、 $\lambda$  鎖遺伝子それぞれ反応性の高いものから 100 個ずつ選択した。両者を混合して Fab-cp3 型の抗体分子の発現と会合がうまく行われているクローンを集めたライブラリー KL200 とした。



- 56 -

### 3. 軽鎖遺伝子ライブラリーと重鎖遺伝子ライブラリーの組み合わせライブラリーの作製

#### 3-1-1 PCR を用いたイムノグロブリン重鎖遺伝子の単離

2-1 と同様の手順を用いて臍帯血、骨髄液、および末梢血のリンパ球、並びに扁桃から human  $\mu$  primer (以下に示すプライマーの 634) あるいは random hexamer を用いて cDNA を調製し、この cDNA を鋳型にして、以下に示すヒト抗体重鎖遺伝子の取得用 5' プライマー (VH1~VH7) と 3' プライマー (human JH プライマー 4 種を等量混合したもの、以下に示すプライマーの 697~700)、または、human  $\mu$  プライマー (以下に示すプライマーの 634) を用いて、PCR を行った。表中、下線をつけた部分は SfiI サイトを示す。hVH2a は germ line VH 2 family に対応していないため、新たに VH2a-2 を設計した。また hVH4a では V H4 ファミリー全体に対応していないため、新たに hVH4a-2 を設計した。VH5a も germ line VH5 subfamily に対応していなかったため新たに VH5a-2 を設計した。また VH7 に対応する primer として hVH7 を設計した。これらについても遺伝子増幅を行い、pscFvCA-E8VHd (0-2) に組み込み、その塩基配列を決定することによって、どのような遺伝子が増幅されたのかを確認した。hVH5a-2 については hVH1a と配列が酷似しているため、hVH1a で増幅させたものと同様の遺伝子産物が得られることが予想されるためこれについては使用しなかった。PCR 産物は、フェノール処理後、エタノール沈殿して 10  $\mu$ L の TE バッファーに懸濁した。

634 hum  $\mu$  CH1R (配列番号: 46) :

ATGGAGTCGGGAAGGAAGTC

各 VH family の増幅に使用した primer

Human VH primer SfiI site を下線で示す

628 hVH1a (配列番号: 47) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG

629 hVH2a (配列番号: 48) :

- 57 -

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGCCATGGCC CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG

630 hVH3a (配列番号 : 49) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGCCATGGCC GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG

631 hVH4a (配列番号 : 50) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG

632 hVH5a (配列番号 : 51) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC

633 hVH6a (配列番号 : 52) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGCCATGGCC CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG

629-2 hVH2a-2 (配列番号 : 53) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGCCATGGCC CAGRTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCC

631-2 hVH4a-2 (配列番号 : 54) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGCCATGGCC CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGG

632-2 hVH5a-2 (配列番号 : 55) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGCCATGGCC GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG

712 hVH7 (配列番号 : 56) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT

Human JH primer BstPI, XhoI site を下線で示す

697 hJH1-2 (配列番号 : 57) :

GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCAGGGTGC

698 hJH3 (配列番号 : 58) :

GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCATTGTCC

699 hJH4-5 (配列番号 : 59) :

GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCAGGGTTC

700 hJH6 (配列番号 : 60) :

GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCGTGGTCC

- 58 -

cDNA	2 $\mu$ L
10 $\times$ buffer #1 (KOD に添付)	10 $\mu$ L
dNTP mix (2.0mM)	10 $\mu$ L
25mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ L
5' 側プライマー (100pmol/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
3' 側プライマー (100pmol/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
滅菌済 MilliQ	71 $\mu$ L
KOD DNA polymerase (東洋紡 2.5U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L

PCR 条件 : 94°C 1 分、55°C 2 分、74°C 1 分を 35 サイクル

### 3-1-2 重鎖遺伝子ライブラリーの作製

3-1-1 で得た PCR 産物を以下の条件で制限酵素処理した。

PCR 産物	10 $\mu$ L
10 $\times$ K buffer (宝酒造)	5 $\mu$ L
滅菌済 MilliQ	33 $\mu$ L
HindIII (宝酒造 15 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
XhoI (宝酒造 12 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L

37°Cで2時間反応後、そのうち10 $\mu$ L分をアガロース電気泳動し、400 bp 付近のバンドを切り出して、ジーンクリーン II キット (フナコシ株式会社) で精製した。PCR 産物と同様に制限酵素処理した pscFvCA-E8VHd (図 2) をジーンクリーン II キットで精製し、制限酵素処理した PCR 産物と以下の条件で 16°Cで4時間〜一晩反応させることによりライゲーションした。

制限酵素処理した pscFvCA-E8VHd	2 $\mu$ l
制限酵素処理した PCR 産物	1 $\mu$ l
10 $\times$ ligation buffer (T4 DNA ligase に添付)	1.5 $\mu$ l
10mM ATP	1.5 $\mu$ l

- 59 -

滅菌済 MilliQ  $8 \mu\text{l}$ T4 DNA ligase (宝酒造  $10 \text{ U}/\mu\text{l}$ )  $1 \mu\text{l}$ 

## 3-1-3 ファージミドの大腸菌への導入

得られた DNA を大腸菌 DH12S に形質転換した。具体的には DNA を一旦エタノール沈殿し、 $1/5\text{TE}$  (TE を滅菌済 MilliQ で 5 倍希釈したもの)  $3 \mu\text{L}$  に溶解する。そのうち、 $1.5 \mu\text{L}$  をコンピテントセル DH12S (GIBCO BRL 製)  $20 \mu\text{L}$  に懸濁し、エレクトロポレーション法により形質転換した。

エレクトロポレーター

BRL 社 Cell-Porator (Cat. series 1600)

設定条件 ; voltage booster  $4\text{k}\Omega$ capacitance  $330 \mu\text{F}$ DC volts Low  $\Omega$ 

charge rate Fast

形質転換用培地 (SOB)  $2\text{ml}$  に上記操作の終了した形質転換大腸菌を植え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間振盪培養したあと、一部を寒天培地 (Amp プレート) にまき、残りは、 $0.1\%$  グルコース、 $100 \mu\text{g/ml}$  アンピシリン含有  $2\times\text{YT}$  培地で培養し、グリセリンストックした。寒天培地は  $30^\circ\text{C}$  でインキュベートし、生えてきたコロニーを楊枝でつついて分離し、それぞれプラスミドを調製し、重鎖遺伝子の塩基配列を調べた。VH1~VH7 の全てについてこれらのことを行い、目的のクローンが得られているかどうか確認した。これらの各グループ (ファミリー) のクローンを *in vivo* での使用頻度に近い比率になるように混合して VH ライブラリーとした。VH ライブラリーにおける各ファミリーの構成比率を以下に示す。

- 60 -

表 4

family	in vivo での 使用頻度(%)*	VH ライブラリー での構成比率(%)
VH1	25	29**
VH2	6.6	7
VH3	40	40
VH4	19	19***
VH5	5	- **
VH6	3.8	4
VH7	1.2	2

\*Griffith AD et al. EMBO J. (1994) 13, 3245-60.

\*\* 実際には VH1 と VH5 は同一のプライマーで増幅されるため、分離して集計できない。

\*\*\*VH4 プライマーで作製した cDNA と VH4-2 プライマーで作製した cDNA を混合してこの割合とした。

### 3-2 組み合わせ遺伝子ライブラリーの作製

VH ライブラリー 200  $\mu$ g を下記条件で HindIII と XhoI で消化し、重鎖遺伝子を切り出して、ジーンクリーン II キットで精製した。

VH ライブラリー 200 $\mu$ g	100 $\mu$ L
10×K buffer (宝酒造)	40 $\mu$ L
滅菌済 MilliQ	205 $\mu$ L
HindIII (宝酒造 40 U/ $\mu$ L)	30 $\mu$ L
XhoI (宝酒造 50 U/ $\mu$ L)	25 $\mu$ L

deletion が無いと確認された軽鎖遺伝子クローン KL200、および VL ライブラリーの挿入されたベクター pFCAH9-E8d についても下記条件で HindIII と XhoI で消化し、軽鎖遺伝子を含む断片を、ジーンクリーン II キットで精製した。

KL200 または VL ライブラリー

を挿入した pFCAH9-E8d	100 $\mu$ g	100 $\mu$ L
10×K buffer (宝酒造)		40 $\mu$ L

- 61 -

滅菌済 Milli-Q	230 $\mu$ L
HindIII (宝酒造 40 U/ $\mu$ L)	15 $\mu$ L
XhoI (宝酒造 50 U/ $\mu$ L)	15 $\mu$ L

次に、VH 遺伝子ライブラリー断片と軽鎖遺伝子の挿入された pFCAH9-E8d ベクターを、次の条件下、16°Cで一晩反応させてライゲーションした。

制限酵素処理した

VH ライブラリー断片	10 $\mu$ g	50 $\mu$ L
-------------	------------	------------

制限酵素処理した KL200 または

VL ライブラリーの断片

を含む pFCAH9-E8d	40 $\mu$ g	50 $\mu$ L
----------------	------------	------------

10 $\times$ ligation buffer

(T4 DNA ligase に添付)	100 $\mu$ L
---------------------	-------------

10mM ATP	100 $\mu$ L
----------	-------------

滅菌済 MilliQ	670 $\mu$ L
------------	-------------

T4 DNA ligase (宝酒造 10 U/ $\mu$ L)	30 $\mu$ L
-----------------------------------	------------

反応の終了した DNA を用いて大腸菌 DH12S を形質転換した。具体的には DNA を一旦エタノール沈殿し、1/5TE (TE を滅菌済 MilliQ で 5 倍希釈したもの) 30  $\mu$  L に溶解した。これをコンピテントセル DH12S (GIBCO BRL 製) 500  $\mu$  L に懸濁し、エレクトロポレーションを行った。

エレクトロポレーター

BRL 社 Cell-Porator (Cat. series 1600)

設定条件 ; voltage booster	4k $\Omega$
capacitance	330 $\mu$ F
DC volts	Low $\Omega$
charge rate	Fast

形質転換用培地 (SOB) 12ml に上記操作の終了した大腸菌を植え、37°Cで 1 時

- 62 -

間振盪培養したあと、一部を寒天培地（Amp プレート）にまき、残りは、0.1%グルコース、100  $\mu$ g/ml アンピシリン含有 2×YT 培地 500 ml で培養し、グリセリンストックした。寒天培地は 30℃でインキュベートし、生えてきたコロニーの数から得られたクローンの数を推定した。それぞれ  $5 \times 10^{10}$  クローンが得られた。

扁桃 mRNA より random hexamer にて合成した cDNA をもとに得た各 VH family を pscFvCA-E8VHd ベクターにクローニングし、KL200 と組み合わせたライブラリーを AIMS1 とした。（ $1.28 \times 10^{10}$  の独立したクローン）

臍帯血、骨髓液、末梢血、扁桃 mRNA より human m primer にて合成した cDNA をもとに得た各 VH family を pscFvCA-E8VHd ベクターにクローニングし、KL200 と組み合わせた遺伝子ライブラリーを AIMS2 とした。（ $3.20 \times 10^{10}$  の独立したクローン）

臍帯血、骨髓液、末梢血、扁桃 mRNA より human m primer にて合成した cDNA をもとに得た各 VH family を VL library と組み合わせたライブラリーを AIMS3 とした。（ $4.50 \times 10^{10}$  の独立したクローン）

更に (AIMS1+AIMS2) : AIMS3 = 1 : 1 で混合し、 $1 \times 10^{11}$  の独立したクローンからなるファージ抗体ライブラリーとした (AIMS4 と呼ぶ)。

### 3-3 組み合わせ遺伝子ライブラリーによるファージライブラリーの作製

#### 3-3-1 ファージライブラリーの調製

1%グルコース及び 100  $\mu$ g/mL のアンピシリンを加えた 2×YT 培地 300mL を入れた 5 リットルのフラスコに AIMS4 懸濁液を 2.5mL を加え、37℃で振とう培養し 1 時間おきに波長 600nm における吸光度を測定しながら、吸光度が 1.0 になるまで増殖させた。培養液にヘルパーファージ液 (M13K07) をフラスコ当たり 12mL 加えてヘルパーファージを感染させ、37℃で 2 時間培養し、ヘルパーファージ感染済み DH12S とした。

3 リットルのフラスコ 24 本に 2×YT 培地 600mL と 100  $\mu$ g/mL のアンピシリン 1.2mL、50  $\mu$ g/mL のカナマイシン 0.8mL、ヘルパーファージ感染済み DH12S 200m

- 63 -

Lを加えて37℃で2時間毎に波長600nmの吸光度を測定しながら振とう培養した。アンピシリンは、測定毎に200 µg/mLとなるよう追加した。培養は波長600 nmにおける吸光度が1.3になるまで行った。

菌体は4℃で8000rpm、10分間遠心し、上清を集めた。上清に20%のポリエチレングリコール/2.5M NaCl 4Lを加えて約20分間静かに攪拌した後、4℃で8000rpm、20分間遠心、沈殿を1LのPBSで溶かし、20%のポリエチレングリコール/2.5M NaCl 200mLを加えて約20分間静かに攪拌した後、4℃で8000rpm、20分間遠心した。上清を捨ててさらに4℃で8000rpm、3分間遠心して沈殿を回収した。沈殿は0.05% NaN<sub>3</sub>を加えたPBSで溶解し、4℃で1000rpm、15分間遠心し、上清を回収した後、4℃で8000rpm、3分間さらに遠心して上清を回収した。

回収したファージ溶液の力価は以下のようにチェックした。すなわち、ファージ溶液をPBSで10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>希釈し、その10 µLをDH12S 990 µLに感染させ、37℃で1時間培養した。これをLBGAプレートに100 µL播いて30℃で18時間培養した。コロニーの数をカウントすることにより希釈前の原液の力価を算出した。ファージ溶液原液を2%スキムミルク及び0.05% NaN<sub>3</sub>を含むPBSに2×10<sup>14</sup>/mlになるよう懸濁した。

### 3-3-2 Fab-cp3を表面に発現しているファージを濃縮する方法

以上のようにして調製したライブラリーには、Fab-cp3をその表面に発現しているファージを選択的に濃縮し、ヘルパーファージやFab-cp3が発現していないファージの混入割合を減少させるための工夫が施されている。すなわち上記ライブラリーを構成するファージが発現する重鎖のC末端には、His6ペプチド（ヒスチジンタグ）が付加されている。ヒスチジンタグを発現したファージは、ニッケルイオンなどに吸着することを利用して容易に回収することができる。具体的にはニッケルイオンが付加されたゲル(Ni-NTA アガロース等)を用いる。操作は以下のとおりである。



- 6 4 -

Ni-NTA アガロースを 2%スキムミルク及び 0.1%Tween20 を含む PBS (以下ブロッキング緩衝液) で室温で 30 分ブロッキングした。次に、重鎖に His-Tag が付加されていない Fab を表面に発現しているファージ (pFCA-E9HL  $\phi$  ; ファージ His-) と重鎖に His-Tag が付加されている Fab を表面に発現しているファージ (pFCAH6-D1.3HL  $\phi$  ; ファージ His+) をファージ His- : ファージ His+ = 100 : 1 となるようにブロッキング緩衝液中で混合した。これらの合計  $1 \times 10^{10}$  CFU のファージ溶液 250  $\mu$ L を Ni-NTA アガロースと混合し、室温 1 時間反応させた。Ni-NTA アガロースをブロッキング緩衝液で洗浄し、次いで 0.5M イミダゾール (pH 7.55) 500  $\mu$ L を加えて Ni-NTA アガロースに結合していたファージを溶出した。

溶出したファージを後 (4-3) で述べる操作にしたがって回収し、回収したクローンを調べてみたところ、23 クローン中 15 クローンがファージ His+ であった (表 3)。このことは Ni-NTA アガロースにより、His6 ペプチドが付加されたファージが 53 倍に濃縮されたことを示している。

この操作を加えることにより、ライブラリーの性能を向上させ、あるいはスクリーニングの能率を上昇させることが可能であることが以上 (4) によって示された。

表 5

	His6-tag の無いファージ	His6-tag を有するファージ
Ni-NTA アガロース処理前	100	1
Ni-NTA アガロース処理後	15	8

#### 4. ファージライブラリーからの特定の抗原に特異的に結合するファージの選択

ファージライブラリーから特定の抗原に特異的に結合するファージを選択する操作を、本明細書ではスクリーニングと呼ぶ。抗原として破傷風トキソイドを用い、本発明による抗体ライブラリーのスクリーニングを行った。

##### 4-1 スクリーニング用試験管の作製

- 65 -

抗原（破傷風トキソイド）を PBS で  $20 \mu\text{g/mL}$  に調製し、試験管 3 本（Nunc 社製 Maxisorp）に 3 mL ずつ添加して  $4^{\circ}\text{C}$  で 18 時間インキュベートして、試験管内表面へ抗原を吸着させた。吸着後、抗原溶液を捨て、2 % スキムミルク含有 PBS 溶液 3 mL ずつを加えて  $25^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させ、ファージ抗体が非特異的に試験管に結合することを防ぐためにブロッキングを行った。

#### 4-2 スクリーニング操作

作製した抗原吸着済試験管に AIMS4 ファージライブラリーを 2 % スキムミルク、0.1 % Tween20 含有 PBS になるよう溶解して  $1 \times 10^{14} \text{CFU/9mL}$  に調製し、この液を試験管 3 本に 3 mL ずつ添加して  $25^{\circ}\text{C}$  で 2 時間反応させた後、0.1 % Tween20 を加えた PBS で 4 回、PBS で 4 回、および滅菌した超純水（Milli-Q にて作製）で 1 回洗浄した。

続いて抗原結合試験管に結合したファージを以下のように回収した。すなわち、0.1 M トリエチルアミン（pH12.3）を試験管 1 本当たり 3 mL 添加し、ローテーターを用いて室温で 20 分間反応させ乖離させた後、1 M Tris-HCl 緩衝液（pH6.8）1.1 mL を加えて中和し、この液を回収した。

#### 4-3 回収したファージの増幅

回収した液は（ファージの大腸菌への感染）（ヘルパーファージの感染）（ファージの回収）の処理を行い、含まれているファージを精製・増幅した。

##### 1) ファージの大腸菌への感染

大腸菌（DH12S）を  $2 \times \text{YT}$  培地 50 mL で培養し、波長 600 nm の吸光度が 0.5 になるよう増殖させ、上記で回収したファージ液を加えて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間振とう培養した。

##### 2) ヘルパーファージの感染

1) の培養液 62.3 mL をとり、 $2 \times \text{YT}$  培地 425 mL、40 % グルコース 12.5 mL、および  $100 \mu\text{g/mL}$  アンピシリン 0.5 mL を加えて  $37^{\circ}\text{C}$  で波長 600 nm における吸光度が 0.5 になるまで培養した後、 $4^{\circ}\text{C}$ 、5000 rpm で 10 分間遠心して菌体を沈殿さ

- 66 -

せ、回収して 100mg/mL アンピシリン 0.3mL を加えた 2×YT 培地 300mL に懸濁した。これにヘルパーファージ M13K07 を 1/100 量加え、37℃で1時間振とう培養した。

培養液を予め 37℃に暖めた培地 (2×YT 培地に 100 μg/mL アンピシリンと 70 μg/mL のカナマイシンを加えた液) 900mL に加えて 37℃で一晩培養した。

### 3) ファージの回収

2) の培養液を 4℃で 7000rpm、10 分間遠心し、その上清に 2.5M の塩化ナトリウムを加えた 20% のポリエチレングリコールを 1/5 量加えて室温で 20 分間静置した後、4℃で 8000rpm、15 分間遠心して沈殿を回収し、培養液の 1/10 量の滅菌 PBS を加えて溶解し、再度 2.5M の塩化ナトリウムを加えた 20% のポリエチレングリコールを 1/5 量加えて 4℃で 10000rpm、20 分間遠心して上清を捨て、さらにスピンドウンして 4℃で 10000rpm、2 分間遠心した。これに 0.05% の  $\text{NaN}_3$  を加えた PBS を培養液の 1/100 量加えて沈殿を溶解し、ファージを回収した。

### 4-4 増幅したファージによる再スクリーニング

増幅したファージを用いて 4-2 と同様に抗原結合試験管を用いてスクリーニングを繰り返した。スクリーニングでの洗浄は、非特異に吸着したファージを乖離し、結合力の高いファージを選択する上で重要なステップであることから、2 回目以降のスクリーニングにおける洗浄条件は以下のようにした。

2 回目 ; PBS+0.1% Tween20 で 6 回、PBS で 6 回、滅菌した超純水で 1 回

3 回目 ; PBS+0.1% Tween20 で 13 回、PBS で 13 回、滅菌した超純水で 1 回

### 4-5 ファージのスクリーニング手技の評価法

4-4 の方法でスクリーニングを繰り返すとき、(抗原吸着済試験管に投入したファージの総数) ÷ (抗原吸着済試験管から回収したファージの総数) が前回のスクリーニングに比べて明らかに小さくなれば、目的の抗体を提示しているファージが濃縮されつつあると推測できる。溶液に含まれるファージ数は、以下のよ

- 67 -

うに計算した。

1) ファージの希釈系列を以下のように作製した。

- [1]  $1 \times 10^{-2}$  希釈 : ファージ液  $10 \mu\text{L}$  + PBS990  $\mu\text{L}$
- [2]  $1 \times 10^{-4}$  希釈 : [1] の希釈液  $10 \mu\text{L}$  + PBS990  $\mu\text{L}$
- [3]  $1 \times 10^{-6}$  希釈 : [2] の希釈液  $10 \mu\text{L}$  + PBS990  $\mu\text{L}$
- [4]  $1 \times 10^{-8}$  希釈 : [3] の希釈液  $10 \mu\text{L}$  + PBS990  $\mu\text{L}$
- [5]  $1 \times 10^{-9}$  希釈 : [4] の希釈液  $100 \mu\text{L}$  + PBS900  $\mu\text{L}$
- [6]  $1 \times 10^{-10}$  希釈 : [5] の希釈液  $100 \mu\text{L}$  + PBS900  $\mu\text{L}$

[4]、[5]、および[6]の希釈系列  $10 \mu\text{L}$  に DH12S 990  $\mu\text{L}$  を加えたものを作り、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間感染させ、これを LBGA プレートに  $100 \mu\text{L}$  まいて  $30^\circ\text{C}$  で 18~24 時間培養し、コロニーを計数した。上記希釈系列のうち、通常[4]のプレートが 50 個以上のコロニーを作る。mL 当たりのファージ数は[4]のプレートのコロニー数に基づいて、以下のように算出される。

原液のファージ数 = (コロニー数 / プレート)  $\times (1 \times 10^8) \times 10^3 \text{ cfu/mL}$

また、回収されたファージ数も同様に計算し、本抗原に対する抗体を提示するファージの数をスクリーニングごとに求めたところ、表 6 のようになった。

表 6

スクリーニング数	洗浄回数	投入したファージ数	回収したファージ数	投入数 / 回収数
1	4	$1.15 \times 10^{14}$	$6.1 \times 10^8$	$1.9 \times 10^5$
2	6	$3.9 \times 10^{13}$	$2.2 \times 10^7$	$1.8 \times 10^6$
3	8	$1.2 \times 10^{13}$	$5.4 \times 10^8$	$2.2 \times 10^4$

#### 4-6 スクリーニングによって得られた抗体の抗原結合活性 (アフィニティー) の測定

以上のスクリーニングによって選択された抗体について、抗原結合活性 (アフィニティー) を測定した。アフィニティーの測定には、ファージ型の抗体ではなく、Fab-cp3 型抗体をサンプルとして用いた。測定方法は、96 ウェルマイクロ

タイタープレートを用いた ELISA 法とした。Fab-cp3 型抗体の発現誘導法については 4-7 で述べる。

まず ELISA 用のプレートを以下のように調製した。抗原 20  $\mu\text{g/mL}$  を 96 ウェルマイクロタイタープレート (Nunc 社製 Maxisorp) の各ウェルに 100  $\mu\text{L}$  添加して 4°C で 18 時間結合させたのち、5%BSA (ブロッキング液) を各ウェルに 200  $\mu\text{L}$  添加して 37°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング液を捨てた後、PBS で 1 回洗浄してアフィニティーの測定に用いた。4-7 の手順で採取した培養上清を各ウェルに 100  $\mu\text{L}$  加え、25°C 1 時間反応させた。反応後、PBS で 4 回洗浄し、5000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ( (株) 医学生物学研究所製) を 100  $\mu\text{L}$  加えて 25°C で 1 時間反応させた。再度 PBS で 4 回洗浄し、オルトフェニレンジアミンと過酸化水素の溶液 100  $\mu\text{L}$  を加えて暫時反応させた後、1.5N リン酸 100  $\mu\text{L}$  を加えて反応を停止し、波長 492nm における吸光度を測定した。その結果 96 クローン中 77 クローンに活性が確認された (図 10)

更にこれら 77 クローンのうち、37 クローンについて中和活性を調べた。表 7 の○が、中和活性を調べたクローンである。中和活性を調べた段階では、まだ塩基配列を確認していなかったため、これらのクローンの中には同じ DNA 配列の組み合わせであるクローンが存在する可能性があった。これらのクローンの塩基配列を決定して照合し、同じ配列の組み合わせを持つものは表 7 では同じ枠内にまとめた。あとで照合してみると同じ DNA 配列の組み合わせを持つクローンは ELISA においても同程度のアフィニティーを示していたことが確認された。

#### 4-7 Fab-cp3 型抗体の発現誘導

ファージの感染した大腸菌を 1%グルコースと 100  $\mu\text{g/mL}$  のアンピシリンを加えた 2×YT で 30°C 18 時間培養した後、0.1%グルコースと 100  $\mu\text{g/mL}$  のアンピシリンを加えた 2×YT 1.5mL に上記培養液を 5  $\mu\text{L}$  加えて 30°C で 4 時間培養した。このときの大腸菌の濃度は波長 600nm の吸光度を測定するとき、約 0.5 であった。

- 69 -

これに 1mM になるよう IPTG (イソプロピル- $\beta$ -D-ガラクトシド) を加えてさらに 30°C で 18 時間培養した後、培養液 1.5mL をエッペンドルフチューブにとり、4°C で 10000r.p.m. 5 分間遠心してその培養上清をとり、0.1% となるようアジ化ナトリウムを添加して検体とした。

Fab-cp3 型抗体が発現しているか否かは 2-3 で示した ELISA 法で確認した。発現が認められたクローンのうち、アガロース電気泳動によって deletion を確認したところ、8 クローンに deletion が認められたが、これらはいずれも抗原結合活性が認められなかった。

#### 4-8 モノクローナル化とファージミドの精製

4-5 「ファージのスクリーニングの評価」の項で得たシングルコロニーのプレートから大腸菌クローンを選択し、LBGA 中で 30°C 18 時間培養した後、倉敷紡績社製 DNA 分離装置 PI-50 File No. 50 を用いてファージミドを精製した。

#### 4-9 モノクローナル抗体の同定

本発明の抗体ライブラリーからスクリーニングによって選択された抗破傷風毒素抗体について、その遺伝子の配列を確認した。配列は、重鎖、軽鎖について以下のプライマーを用い、サーモシークエンスキット (アマシャム・ファルマシア製) とアロカ社製 L1-COR4200L(S)-2 を使用したジデオキシ法によって決定した。結果を表 7 にまとめた。表 7 では、塩基配列決定の結果、同じクローンであることが判明したクローンをまとめて示した。表中の H-chain に示した番号と L-chain に示した番号の組み合わせが同一となっているクローンが、同じ塩基配列を含むクローンである。表 7 に示すように、36 種類のクローンが得られていたことがわかった。

重鎖のシークエンシング用プライマー：蛍光 T7 プライマー (アロカ製)

軽鎖のシークエンシング用プライマー：蛍光プライマー huCH1J (配列番号：45)

- 70 -

表 7

clone No.	ELISA 吸光度	H-chain DNA sequence ID番号.	VH1分類	KL200	germ lineVL	H-L遺伝子 組合わせ ID番号	中和活性 試験実施
TETM18	0.7321	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	○
TETM40	0.7185	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	○
TETM42	0.6266	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	○
TETM51	1.1731	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	
TETM53	1.2410	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	
TETM57	1.1961	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	
TETM61	1.1833	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	
TETM63	1.1912	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	
TETM68	1.1971	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	
TETM70	1.1911	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	
TETM72	1.2544	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	
TETM76	1.1253	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	
TETM81	1.1559	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	
TETM84	0.9991	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	
TETM85	0.9737	1	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	1	
TETM24	0.7613	1	DP10(VH1)	13b-10b , 13b-6b	3I	12	○
TETM02	0.6460	2	DP10(VH1)	13b-12b	3I	4	○
TETM09	0.7987	2	DP10(VH1)	13b-12b	3I	4	○
TETM44	0.4468	2	DP10(VH1)	13b-12b	3I	4	
TETM93	0.6824	2	DP10(VH1)	13b-12b	3I	4	
TETM14	0.6707	2	DP10(VH1)	13b-10b , 13b-6b	3I	3	○
TETM25	0.6402	2	DP10(VH1)	13b-10b , 13b-6b	3I	3	○
TETM47	0.5186	2	DP10(VH1)	13b-10b , 13b-6b	3I	3	
TETM48	0.5222	2	DP10(VH1)	13b-10b , 13b-6b	3I	3	
TETM86	0.8435	2	DP10(VH1)	13b-10b , 13b-6b	3I	3	○
TETM89	0.9117	2	DP10(VH1)	13b-10b , 13b-6b	3I	3	
TETM49	1.2680	2	DP10(VH1)	VL library	3I	13	○
TETM64	1.3011	2	DP10(VH1)	VL library	3I	14	
TETM16	0.6521	3	DP10(VH1)	13b-12b	3I	2	○
TETM22	0.7705	3	DP10(VH1)	13b-12b	3I	2	○
TETM26	0.7478	3	DP10(VH1)	13b-12b	3I	2	○
TETM33	0.7425	3	DP10(VH1)	13b-12b	3I	2	○
TETM43	0.6578	3	DP10(VH1)	13b-12b	3I	2	○
TETM45	0.6392	3	DP10(VH1)	13b-12b	3I	2	○
TETM46	0.6056	3	DP10(VH1)	13b-12b	3I	2	○
TETM55	1.2684	3	DP10(VH1)	13b-12b	3I	2	
TETM15	1.9333	3	DP10(VH1)	L3BUM4	3I	15	○
TETM96	0.6639	4	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	16	○
TETM73	1.0694	4	DP10(VH1)	13b-10b , 13b-6b	3I	17	
TETM80	1.1280	4	DP10(VH1)	VL library	3I	7	
TETM83	0.9669	4	DP10(VH1)	VL library	3I	7	
TETM03	0.7537	4	DP10(VH1)	13b-1b	3I	18	○
TETM71	1.1197	4	DP10(VH1)	L3BUM1	3I	19	
TETM19	0.8051	5	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	8	○
TETM92	0.9295	5	DP10(VH1)	L3BUM6	3I	8	
TETM12	0.7983	5	DP10(VH1)	13b-12b	3I	20	○
TETM30	0.6473	5	DP10(VH1)	13b-1b	3I	21	○

- 7 1 -

TETM28	0.6622	5	DP10(VH1)	L3BUM1	3l	22	○
TETM37	0.6879	6	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	6	○
TETM52	1.1214	6	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	6	
TETM54	1.2341	6	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	6	
TETM66	1.0685	6	DP10(VH1)	13b-10b , 13b-6b	3l	23	
TETM41	0.6138	6	DP10(VH1)	13b-1b	3l	24	○
TETM06	0.8287	7	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	5	○
TETM60	1.5267	7	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	5	
TETM62	1.2762	7	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	5	
TETM82	1.2137	7	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	5	
TETM08	0.8469	8	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	9	○
TETM75	0.9548	8	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	9	
TETM32	0.7325	9	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	25	○
TETM94	0.8597	9	DP10(VH1)	13b-12b	3l	26	
TETM31	0.7118	10	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	27	○
TETM74	1.1040	10	DP10(VH1)	VL library	3l	28	
TETM34	0.6607	11	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	10	○
TETM67	1.2017	11	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	10	
TETM17	0.7207	12	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	11	○
TETM29	0.7073	12	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	11	○
TETM01	0.7729	13	DP10(VH1)	VL library	3l	29	○
TETM13	0.6374	13	DP10(VH1)	13b-10b , 13b-6b	3l	30	○
TETM21	0.7280	14	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	31	○
TETM56	1.3910	15	DP10(VH1)	VL library	3l	32	
TETM58	1.3259	16	DP77(VH3)	k6-17b	DPK15	33	
TETM69	0.9722	17	DP10(VH1)	L3BUM6	3l	34	
TETM88	2.1405	18	DP14(VH1)	VL library	DPK9	35	○
TETM91	1.2441	19	DP75(VH1)	k1-5.b	DPK9	36	

#### 4-10 中和活性検定用 Fab-cp3 型抗体の採取

本発明の抗体ライブラリーからスクリーニングによって選択された抗体の、破傷風毒素に対する中和活性の有無を検討した。まず抗体活性のあった 77 クローンについて、発現前の培養液と、1% グルコース、100mg/mL アンピシリンを加えた 2×YT 培地(YTA)で 30℃で一晩培養した後、0.1% グルコース YTA で 30℃ 3 時間培養したのち、1M IPTG を加え、30℃で 20 時間培養した。10000rpm で 5 分間遠心して上清をとり、60%になるよう硫酸を加えて 1 時間振とうした。さらに 12000rpm で 10 分間遠心して上清を除き、沈殿に PBS を加えて溶解後、50 倍量以上の PBS に対して 2 時間透析した。これを 3 回繰り返した後、エッペンドルフチューブに移して 15000rpm で 4℃、10 分間遠心し、上清をろ過した後、破傷風毒素に対する中和活性を検討した。



- 7 2 -

## 4-11 中和活性の検討

まず、抗体自体の毒性を確認するため、上記で得た抗体溶液 0.2mL をマウスの腹腔と尾静脈内に注射した。その結果、抗体溶液には毒性は認められなかった。次に、抗体注射後約 1 時間で、マウス最小致死量 (1MLD または約 2LD<sub>50</sub>) の 10 倍量の破傷風毒素を後肢内股部皮下に注射した。その結果、各抗体を注射したマウスは約半数において部分的中和能 (毒素による発症時期の遅延、4～7 日) が認められた。中和抗体 (標準破傷風抗毒素) または中和能のない抗体を注射したマウスは、破傷風毒素による特異的麻痺が観察された後、約 2 日で死亡した。部分的中和活性を示したクローンは、TETM1, TETM13, TETM26, TETM96 であった。したがって、本発明の抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって、中和活性を持つ有効な抗体を得られることが証明されたと言える。

## 4-12 抗体可変領域の配列決定

上記のとおり、本発明者らは破傷風トキソイド (毒素) に結合し、これを中和する抗体可変領域を発現するファージを得ることができた。

さらに、上記工程を繰り返すことにより、中和活性を持つが互いに異なる塩基配列を持つ別のファージクローンを得ることもできた。具体的にはクローン番号 TETM13 と TETK36 が強い中和活性を持つと判断された。これらファージクローンが有する重鎖と軽鎖の塩基配列、およびこの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を以下の配列番号として記載する。

クローン番号	重鎖	軽鎖
TETM13 (塩基配列)	6 3	6 4
TETM13 (アミノ酸配列)	8 1	8 2
TETK36 (塩基配列)	6 5	6 6
TETK36 (アミノ酸配列)	8 3	8 4

## 5. 選択をかけない軽鎖遺伝子ライブラリーと、KL200 ライブラリーの比較

選択をかけない軽鎖遺伝子ライブラリーを使用して作製した重鎖との組合せライブラリー(AIMS3)と、選択した軽鎖遺伝子ライブラリーKL200を使用して作製した重鎖との組合せライブラリー(AIMS1+AIMS2)とでライブラリーの性能を比較した。

まず選択されたクローンの数の比較においては、本発明による抗体ライブラリーである AIMS1+AIMS2 が、圧倒的に有利であることが明らかとなった。選択をかけた軽鎖遺伝子ライブラリーである AIMS1+AIMS2 から選択されたクローンは、前記表 7 における、KL200 のカラムに KL200 におけるクローンの名称が記載された 29 クローンである。一方、AIMS3 からは 7 クローン（前記表 7 における、KL200 のカラムが VL Library となっているクローン）が選択された。つまり、等量で混合したライブラリーを用いたのにもかかわらず選択されたクローンの 80%以上(29/36)が本発明によるライブラリーに由来するクローンであった。このように、スクリーニングで得られたファージ数の比較により KL200 を用いて作製したファージライブラリーが有利であることを示すことができた。

#### 5-2 スクリーニングによって得られたファージの抗体活性の比較

次に、選択された抗体の活性について比較した。4-11 で述べた中和活性の試験において部分的中和能が確認されたクローンは、次の 4 クローンである。

TETM1 (AIMS3)

TETM13 (AIMS1+AIMS2)

TETM26 (AIMS1+AIMS2)

TETM96 (AIMS1+AIMS2)

つまり、AIMS1+AIMS2 から 3 クローン、AIMS3 から 1 クローンが選択されていた。この割合は、スクリーニングで得られたクローンの数の割合（29：7）とほぼ同様である。しかも、本発明によるライブラリーに由来する AIMS1+AIMS2 から選択された 3 クローンには、最も中和活性の強いクローンである TETM13 が含まれていた。したがって、抗体の機能の面からみても、選択された軽鎖ライブ

- 74 -

ライリーKL200 を用いて作製したファージライブラリーのスクリーニングによって優れた抗体を効率的に選択できることが確認できた。

## 6. ファージライブラリーからの特定の抗原に特異的に結合するファージの選択－2

抗原としてジフテリアトキソイドを用い、本発明による抗体ライブラリーから、抗体のスクリーニングを試みた。スクリーニングに用いたライブラリーは、4 と同じ AIMS4 ファージライブラリーである。このライブラリーは、AIMS3（選択をかけない軽鎖遺伝子ライブラリーと重鎖遺伝子ライブラリーを組み合わせたライブラリー）と、AIMS1+AIMS2（選択をかけた軽鎖遺伝子ライブラリーと重鎖遺伝子ライブラリーを組み合わせたライブラリー）の混合液からなっている。

### 6-1 スクリーニング用試験管の作製

抗原（ジフテリアトキソイド）を PBS で  $20 \mu\text{g/mL}$  に調製し、試験管 3 本（Nunc 社製 Maxisorp）に 3 mL ずつ添加して  $4^{\circ}\text{C}$  で 18 時間感作した。抗原感作後、抗原溶液を捨て、2 % スキムミルク含有 PBS 溶液 3 mL ずつを加えて  $25^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させ、ブロッキングした。

### 6-2 スクリーニング操作

作製した抗原結合試験管に、4 と同じファージライブラリーを 2 % スキムミルク、0.1 % Tween20 含有 PBS になるよう溶解して  $1 \times 10^{14} \text{CFU/9mL}$  に調製し、この液を試験管 3 本に 3 mL ずつ添加して  $25^{\circ}\text{C}$  で 2 時間反応させた後、0.1 % Tween20 を加えた PBS で 4 回、PBS で 4 回及び滅菌した超純水（MilliQ にて作製）で 1 回洗浄した。

続いて抗原結合試験管に結合したファージを以下のように回収した。すなわち、0.1 M トリエチルアミン（pH12.3）を試験管 1 本当たり 3 mL 添加し、ローテーターを用いて室温で 20 分間反応させ乖離させた後、1 M Tris-HCl 緩衝液（pH6.8）1.1 mL を加えて中和し、この液を回収した。

### 6-3 回収したファージの増幅

- 75 -

回収した液は実施例 4-3 および 4-4 と同じ（ファージの大腸菌への感染）（ヘルパーファージの感染）（ファージの回収）の操作を繰り返した。洗浄条件も実施例 4-4 の（スクリーニング）と同様に行った。

#### 6-4 ファージのスクリーニング手法の評価

ここで得られた発現の認められたクローンについて、軽鎖の塩基配列を決定してその由来を確認したところ、20 クローンは (AIMS1+AIMS2) 由来であったのに対し、(AIMS4) からは 16 クローンが選択された。

さらに、これらのクローンの中に実際に使用可能な活性の高いクローンが含まれているか否かについて検討した。ジフテリア毒素に対する抗体の中和活性は、培養細胞を用いた Cell Culture Method (CCM) によって定量した。CCM 法は以下のように行った。

標準抗毒素の溶液は、国内標準ジフテリア抗毒素 Lot. 9 の 1 アンプルを 0.2w/v%ゼラチン加 PBS で溶解し、更に 3%cs 培地（精製水 1,000mL にイーグル MEM9.4g、L-グルタミン 0.3g、ペニシリン 20 万単位/2mL、ストレプトマイシン 0.1g 力価/0.5mL、グルコース 3.0g、子牛血清 30mL、1%フェノールレッド 3mL、及び 7w/v%重炭酸ソーダ 20mL を含む）で 10IU/mL に調製し、使用した。

試験毒素の溶液はジフテリア試験毒素 (Lot. M59) 1 バイアル (Lf/vial =2.5、 $CD_{50}/vial=1.6 \times 10^5$ ) を 0.2w/v%ゼラチン加 PBS で溶解し、3%cs 培地で  $1.6 \times 10^4 CD_{50}/mL$  に調製した後、更に 3%cs 培地で希釈して用いた。細胞は 7% cs 培地（精製水 1,000mL にイーグル MEM9.4g、L-グルタミン 0.3g、ペニシリン 20 万単位/2mL、ストレプトマイシン 0.1g 力価/0.5mL、子牛血清 70mL、1%フェノールレッド 3mL、及び 7w/v%重炭酸ソーダ 20mL を含む）で継代培養した VERO 細胞を用いた。

96 穴マイクロプレート中に 3%cs 培地で標準抗毒素、被験抗体の希釈系列（各 25  $\mu$ L）を作製し、これに調製した上記ジフテリア毒素 (25  $\mu$ L) を加え 37°C30 分処理した後、3% cs 培地で細胞数を  $3 \times 10^5$  cells/mL に調製した VERO 細胞 50  $\mu$ L

- 76 -

と、さらに 3%cs 培地 100  $\mu$ L を加えてシールし、37°C のインキュベーターで 4 日間培養した。pH 指示薬の色調の変化（オレンジを目安とする）から、本測定系における標準抗毒素のエンドポイントを求め、被験抗体のエンドポイントを示した希釈倍数をエンドポイントの抗毒素価に乗じて、被験抗体の抗毒素価とした。本測定系における標準抗毒素のエンドポイントは 0.0046IU/mL であった。

その結果、CCM 法では試験した 43 クローン中 1 クローンが 0.0520IU/mL と、ジフテリアトキソイド（毒素）に対して中和活性を示した。しかし、AIMS3（選択をかけない軽鎖遺伝子用いたライブラリー）からは活性のあるクローンは得られなかった。これらの結果から、本発明に基づく抗体ライブラリー AIMS1+AIMS2 は、生体内の抗体の多様性を高度に再現した優れたライブラリーを与えることが明らかである。

本発明者らはジフテリア毒素に結合し、これを中和する能力をもつファージクローン (DTD10) も得ることができた。これらファージクローンが有する重鎖と軽鎖の塩基配列、およびこの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を以下の配列番号として記載する。

DTD10 の重鎖塩基配列／配列番号：61、アミノ酸配列／配列番号：79

DTD10 の軽鎖塩基配列／配列番号：62、アミノ酸配列／配列番号：80

## 7. ファージライブラリーからの特定の抗原に特異的に結合するファージの選択－3

抗原としてインフルエンザウイルス由来の抗原を用い、本発明による抗体ライブラリーから、抗体のスクリーニングを試みた。これ以降インフルエンザウイルス株名を以下のように省略して表記する。ただし、( ) 内はウイルスの亜型を示す。

ウイルス株名称

省略名称

A/New Caledonia/20/99 株 (H1N1)

ニューカレドニア株 (H1N1)

- 77 -

A/Sydney/5/97 株 (H3N2)	シドニー株 (H3N2)
A/Okuda/57 株 (H2N2)	奥田株 (H2N2)
A/北京/262/95 株 (H1N1)	北京株 (H1N1)

#### 7-1 インフルエンザウイルス由来抗原の精製

当業者には衆知の方法を用いて以下のようにインフルエンザウイルス抗原の精製を行なった。国立感染症研究所から購入したワクチン株を孵化鶏卵に接種し、33～35℃で2日間培養した。培養後、4℃の冷蔵庫で1晩放置し、常法に従い感染尿膜腔液を採取した。次いで、限外ろ過法・通常の生化学的方法などで濃縮し、ショ糖密度勾配遠心法で精製した。すなわち、0～60%のショ糖の密度勾配中で濃縮ウイルスを回転数 35000rpm で超遠心し、ショ糖密度が 40%前後の画分を採取した。このウイルス精製画分をエーテルで処理した（エーテル不活化ウイルス）。こののちにホルマリンを添加しショ糖密度勾配遠心法でさらに精製してインフルエンザ精製抗原を得た。

#### 7-2 北京株(H1N1)を用いたファージ抗体の単離

##### 7-2-1 スクリーニング用試験管の作製

北京株(H1N1)から7-1の手順で抽出したインフルエンザウイルス抗原をPBS中で12.5  $\mu$ g/mlの濃度で溶かし、イムノチューブ (Polysorp) に4.5ml入れて4℃18時間あるいは25℃2時間、穏やかに転倒混和してインフルエンザウイルス抗原をイムノチューブ内表面に結合させた。インフルエンザウイルス抗原溶液を除いたのち、2%の濃度でPBSに解かしたスキムミルクを4.5mlチューブに入れ、4℃で18時間あるいは25℃で1時間反応させ非特異的反応を防ぐブロッキング処理を行なった。

##### 7-2-2 スクリーニング操作

上記のようにして作製した抗原結合済みのイムノチューブに2%スキムミルク in PBSに懸濁した実施例4と同じAIMS4ファージライブラリー4.5mLを入れ、2

- 78 -

5℃で2時間転倒混和して反応させ、チューブ上に結合したインフルエンザウイルス抗原と AIMS4 ファージライブラリーを接触させた。

上記の接触が終わったのち、ファージ懸濁液を除き、以下の表8に示す緩衝液で表に示す回数洗浄し、チューブに結合しているファージ以外のファージを取り除いた。

表 8

スクリーニング	洗 浄 液		
	P B S + T	P B S	蒸留水
1st	4	4	1
2nd	6	6	1
3rd	1 3	1 3	1

P B S + T : P B S + 0.1% T w e e n 2 0

次に 0.1M トリエチルアミン pH12.3 を 4.5ml チューブに添加し、20 分室温で転倒混和して、ファージをチューブから乖離させて別の新たなチューブに移し、直ちに 1M Tris-HCl pH6.8 を 1.1ml 加えて中和した。

#### 7-2-3 回収したファージの増幅

大腸菌DH12S (2 x YT培地) 50ml (2ndスクリーニング以降は30mL) をOD600nm=0.5になるように予め増やしておき、上記の過程で得たファージ液を加え、抗原結合ファージを37℃ 1時間振とう培養し感染させた。

前述の大腸菌液を全体で 500ml になるよう以下の如く希釈した。(3 L フラスコ使用)

大腸菌液	61.25ml
2 x YT	425ml
40% グルコース	12.5ml (終濃度 1%)
100mg/ml Ampicillin	0.5ml (終濃度 100 $\mu$ g/ml)

上記の希釈済み大腸菌液をさらに 37℃ 1～2 時間培養したのち、4℃に移し終夜保存した。

- 79 -

終夜保存したフラスコを再び、37℃に戻し振盪培養した。OD<sub>600nm</sub>=0.5 になったら、5000 rpm 10 分、4℃にて滅菌遠心管を用いて遠心し、菌体を回収した。

回収した菌体に 2xYT 培地 1 ~ 2 ml を加え溶かしたのち、一部をとって、グリセロール・ストックを作製した。（最終グリセロール濃度 20%）

残りの菌体には 2xYT 培地 300ml（ただし、3rd, 4th スクリーニングの場合はそれぞれ 150ml, 50ml）に終濃度 100  $\mu$ g/ml のアンピシリンを加え培養した。OD<sub>600nm</sub>=0.5 に到達したとき、さらにヘルパーファージ M13K07 を培養液の 1/100 量加え、37℃で 1 時間振盪培養し、ヘルパーファージを感染させた。

上記の培養液の一部を取り、2 × TY 寒天培地上に播き、ヘルパーファージの感染した大腸菌数の計測に供した。残りの培養液には新たな培養液（100  $\mu$ g/ml の Ampicillin を含有し、70  $\mu$ g/ml の Kanamycine を含有した 900ml 2 × TY 培地、37℃にあらかじめ保温しておく）を加え、37℃で終夜振盪培養することで、ヘルパーファージが感染した大腸菌を選択した。

終夜培養後、培養液を 7000 r.p.m 10 分 4℃（滅菌ずみ遠心管 1000ml 用を使う）で遠心分離して菌体を沈殿させ、上清を回収した。上清に 1/5 体積の 2.5M NaCl 含有 20% ポリエチレングリコール溶液を加え、20 分室温で静置したのち、8000 r.p.m 15 分 4℃で遠心分離して沈殿させる事によってファージを回収した。

沈殿を崩さないように上清を除き、培養液の 1/10 体積の滅菌 PBS で沈殿を溶かした。さらに、2.5M NaCl 含有 20% ポリエチレングリコールを PBS の 1/5 体積加え、10000 r.p.m 20 分 4℃（滅菌ずみ遠心管 200ml 用を使う）で遠心してファージを沈殿させることにより不純物を取り除いた。沈殿したファージに 0.05% NaN<sub>3</sub> PBS を培養液の 1/100 加え、シェイカーを使用して、約 2 時間振盪することにより懸濁した。

以上の工程によって得られたファージは、さらに同様の 2 回のスクリーニング工程に供した。しかし、この方法ではインフルエンザウイルスの NP というタンパク質に反応する抗体しか得られず、インフルエンザウイルスを中和する能力



は無かった。

### 7-3 ニューカレドニア株 (H1N1) を用いた亜型特異的に反応するファージ抗体の単離

インフルエンザを中和する抗体のエピトープはウイルス表面の HA タンパク質にあると言われており、また、HA タンパク質は各ウイルス株間で変異の大きい箇所でもある。そこで、ウイルス株に特異的に反応する抗体を単離することで中和抗体を得ることを試みた。

#### 7-3-1 抗 NP 抗体吸収済ライブラリーの準備

インフルエンザウイルス奥田株 (H2N2) を用いて 7-1 の手順に従いエーテル処理不活化ウイルスを作製した。不活化ウイルス  $20 \mu\text{g/ml}$  を PBS に溶解し、この溶液を反応用チューブ  $3\text{ml/本}$ 、3 本に添加し、 $4^{\circ}\text{C}$  18 時間反応させた。反応後液を捨て、2% スキムミルク in PBS で 1 時間反応させた。AIMS4 ライブラリー LOT000614/2% スキムミルク in PBS を  $1 \times 10^{14}\text{CFU/9ml}$  を上記 3 本の tube に加えた。室温 2 時間  $25^{\circ}\text{C}$  攪拌しながら反応させた。この反応終了後のライブラリーを抗 NP 抗体吸収済 AIMS4 ライブラリーとした。

#### 7-3-2 目的抗原ニューカレドニア株 (H1N1) 由来抗原を用いたスクリーニング操作

上記と同様に作製したニューカレドニア株 (H1N1) ホルマリン処理不活化ウイルスを  $100 \mu\text{g/ml}$  になるように PBS に溶解した。この溶液を反応用チューブ  $3\text{ml/本}$ 、3 本に添加し、 $4^{\circ}\text{C}$  18 時間反応させた。反応後、液をすて、非特異的反応を防止するため 2% スキムミルク in PBS を加え 1 時間インキュベートした。保温終了後、7-3-2 で作製した抗 NP 抗体・吸収済 AIMS4 ライブラリーを上記 3 本のチューブに加えた。2 時間  $25^{\circ}\text{C}$  にて攪拌しながら反応させた。反応後 PBS で洗浄した。洗浄回数は以下の表 9 を参照。

洗浄後、0.1M トリエチルアミン pH12.3 を  $3\text{ml/tube}$  加え、室温 20 分、ローターで攪拌しながら反応させファージを抗原と乖離し、1M Tris-HCl pH6.8 を

- 8 1 -

1ml加えて中和した（抗原結合ファージの回収）。大腸菌DH12S（2 x YT培地）50mlをOD600nm 0.5~1.0になるように予め増やしておき、抗原結合ファージを37°C 1時間振とう培養し、感染させた。

7-2-3と同様に回収したファージの増幅工程を行ない、増幅後抗NP抗体を7-3-1と同様に吸収し、ファージ液の力価を以下のように測定した。力価を算出した後、同様のスクリーニング過程に増幅ファージ液を用いた。スクリーニング操作は3回繰返した。

#### 7-3-3 ファージの力価測定

次回のスクリーニングに用いるファージ液の力価をあらかじめ以下の要領で調べた。

希釈系列を下記のように作製した。

1.  $1 \times 10^{-2}$  希釈 : ファージ液  $10 \mu\text{l}$  + PBS  $990 \mu\text{l}$
2.  $1 \times 10^{-4}$  希釈 : 1の希釈液  $10 \mu\text{l}$  + PBS  $990 \mu\text{l}$
3.  $1 \times 10^{-6}$  希釈 : 2の希釈液  $10 \mu\text{l}$  + PBS  $990 \mu\text{l}$
4.  $1 \times 10^{-8}$  希釈 : 3の希釈液  $10 \mu\text{l}$  + PBS  $990 \mu\text{l}$
5.  $1 \times 10^{-10}$  希釈 : 4の希釈液  $10 \mu\text{l}$  + PBS  $990 \mu\text{l}$
6.  $1 \times 10^{-12}$  希釈 : 5の希釈液  $10 \mu\text{l}$  + PBS  $990 \mu\text{l}$

4, 5, 6の希釈系列  $10 \mu\text{l}$  にDH12S  $990 \mu\text{l}$  を加えたものをつくり、37°C 1時間感染させ、これをLBGAプレートに  $100 \mu\text{l}$  まき 30°C 18~24時間培養後コロニーをカウントした。

4, 5, 6のうち、50個/プレート以上コロニーをつくったプレートをデータとして採用した。

次回のスクリーニングに用いるファージ力価の計算式（4.の場合）

$$= (\text{コロニー数/プレート}) \times (1 \times 10^8) \times 10^3 \text{ ファージ/ml}$$

- 82 -

表 9

奥田株 (H2N2) 吸収済みニューカレドニア株 (H1N1)

スクリーニング	洗浄回数	input*	output**	1 / (Input/Output)
1 s t	4	$1.0 \times 10^{14}$	$9.1 \times 10^8$	$1 / (1.1 \times 10^6)$
2 n d	8	$4.6 \times 10^{13}$	$1.1 \times 10^8$	$1 / (5.1 \times 10^6)$
3 r d	16	$4.0 \times 10^{13}$	$4.7 \times 10^{10}$	$1 / (8.5 \times 10^2)$

\*7-3-3 から求められる。単位 (cfu/ml)。

\*\*8-3-2 のスクリーニング過程で回収された増幅前のファージから算出する。単位 (cfu/ml)。

## 7-4 H3N2 亜型特異的中和抗体の単離方法

## 7-4-1 目的抗原シドニー株 (H3N2) 由来抗原を用いたスクリーニング

インフルエンザウイルスシドニー株 (H3N2) ・ホルマリン処理不活化ウイルス  $100 \mu\text{g/ml}$  を PBS に溶解し、この溶液を Nunc Polysorp 4.5ml/本、3 本に添加し、 $4^\circ\text{C}$  18 時間反応させた。反応後溶液を捨て、2% スキムミルク in PBS で 1 時間ブロッキングした。その後、7-3-1 で作製した抗 NP 抗体・吸収済 AIMS 4 ライブラリーを上記 3 本の tube に加え、室温 2 時間  $25^\circ\text{C}$  ローテーターを用いて振盪反応させた。

反応後 PBS で以下の表 10 に示す回数洗浄した。

洗浄後、0.1M トリエチルアミン pH12.3 を 3ml/tube 加え、室温 20 分、ローテーターで攪拌しながら反応させファージを抗原と乖離した。1M Tris-HCl pH6.8 を 1ml 加えて中和した (抗原結合ファージの回収)。

大腸菌 DH12S (2 x YT 培地) 50ml を OD600nm 0.5~1.0 になるように予め増やしておき、抗原結合ファージを  $37^\circ\text{C}$  1 時間振とう培養し、感染させた。

7-2-3 と同様に回収したファージの増幅工程を行ない、増幅後抗 NP 抗体を 7-3-1 と同様に吸収し、ファージ液の力価を 7-3-3 と同様に測定した (表 11)。力価を算出した後、同様のスクリーニング過程に増幅ファージ液を用いた。スク

- 83 -

リーニング操作は3回繰返した。

表 10

奥田株 (H2N2) 吸収済みシドニー株 (H3N2)

スクリーニング	洗浄回数	Input*	Output*	1 / (Input/Output)
1 s t	4	$1.0 \times 10^{14}$	$1.0 \times 10^9$	1/ ( $1.0 \times 10^5$ )
2 n d	8	$4.0 \times 10^{13}$	$3.3 \times 10^7$	1/ ( $1.2 \times 10^6$ )
3 r d	16	$5.6 \times 10^{13}$	$2.8 \times 10^{10}$	1/ ( $2.6 \times 10^3$ )

\*7-3-3 から求められる。単位 (cfu/ml)。

\*\*7-3-2 のスクリーニング過程で回収された増幅前のファージから算出する。単位 (cfu/ml)。

#### 7-5 インフルエンザウイルスを中和するファージ抗体の評価

##### 7-5-1 Fab 型抗体の誘導

ファージの感染した大腸菌を発現誘導した後長期培養することにより、ファージではなく、Fab 型の抗体が大腸菌から培養液中に分泌されることを本発明者らは見出した。

上記の工程 7-2-3、7-3-3、および 7-4-1 から得られたファージを含む大腸菌のコロニーから大腸菌を  $2 \times \text{YT} + 0.1\% \text{ グルコース} + 100 \mu\text{g/ml Ampicillin}$  に植菌して  $30^\circ\text{C}$  で培養し、OD600nm が 0.5 付近になったところで IPTG を最終濃度 1mM となるよう添加し、 $30^\circ\text{C}$  18 時間培養することによりファージ抗体を誘導した。

また、別に IPTG を入れないで 18 時間培養したものを準備し、終濃度 30% のグリセロールを加えて保存用大腸菌を作製した。

##### 7-5-2 ELISA 法による Fab 型抗体の特性の確認

Fab 型抗体を発現させた 7-5-1 の培養液を 1.5ml チューブにいれ、10000rpm、 $4^\circ\text{C}$  5 分遠心した。培養上清をとり、終濃度 0.1% の  $\text{NaN}_3$  を加え ELISA サンプルとした。

- 8 4 -

次に、スクリーニングに用いた際に用いた濃度と同じ濃度の抗原を 96well ELISA プレートに  $100\mu\text{l}$ /well 加え  $4^{\circ}\text{C}$ 18 時間保温することにより抗原をプレートに結合した。その後、2.5%BSA in PBS を  $200\mu\text{l}$ /well 加え、 $4^{\circ}\text{C}$ 18 時間保温することによりブロッキングした。

ELISA 試験実施前に、ブロッキング液をすて、PBS で一回洗った。7-5-1 で誘導した培養上清を  $100\mu\text{l}$ /well 加え、 $25^{\circ}\text{C}$ 1 時間反応させた。終了後、PBS で 4 回ウェルを洗浄し、POD 結合抗ヒト IgG (MBL 社 Cat#206 LOT150) を 5000 倍希釈し  $100\mu\text{l}$ /well 加え、 $25^{\circ}\text{C}$ 1 時間 (または、 $37^{\circ}\text{C}$  1 時間、室温 250rpm. 振盪しながら 30 分) 反応させた。終了後、PBS で 4 回洗浄し、基質溶液を  $100\mu\text{l}$ /well 加えた。基質溶液は以下のように作製した：0.1M クエン酸-リン酸水素 2 ナトリウム pH5.1 に終濃度 0.01%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 12ml を加え、さらに OPD 錠 (和光純薬社、生化学用 Code# 158-01671) を 1 錠加えた。15~30 分後 OD492nm をプレートリーダーによって吸光度を測定した。

その結果、ELISA においてニューカレドニア株 (H1N1) から 1 クローン、シドニー株 (H3N2) から 3 クローンの株特異的な反応性を示す中和抗体が得られたことが分かった。これらの 4 クローンの反応性を以下の表 1 2 に示した。

表 1 1

抗原	奥田株 (H2N2) 吸収済 ニューカレドニア株 (H1N1)	奥田株 (H2N2) 吸収済 シドニー株 (H3N2)
試験したコロニー数	4 8	4 8
遺伝子の欠失なし*	3 7	2 9
ELISA 陽性	3 5	2 7
うち抗原に株特異性	1	2

\*遺伝子の塩基配列解読の結果、配列に欠失が起っていなかったもの

- 8 5 -

表 1 2

スクリーニング抗原	クローン 番号	抗原感作プレート		
		ニューカレドニア 株 (H1N1)	奥田株 (H2N2)	シドニー株 (H3N2)
ニューカレドニア株 (H1N1)	NC1	1.991	0.052	0.098
シドニー株(H3N2)	SY39	0.090	0.080	1.612
シドニー株(H3N2)	SY47	0.080	0.056	2.859
コントロール A n t i N P	IF8	2.966	2.438	2.923
ネガティブ コントロール		0.090	0.057	0.065

### 7-5-3 プラスミドの精製とシークエンシング

2 x YT 培地 (0.1 % グルコース + 200  $\mu$ g/ml Ampicillin 含有) で一晩培養し、DNA 分離装置 (倉敷紡績社 P I -50) にて操作法に従って、プラスミドを精製した。精製したプラスミドには最終濃度 20  $\mu$ g/ml の RNase を添加してフェノール・クロロホルム処理し、-20°C 以下にて保存した。

得られたファージ抗体が有している抗体遺伝子はシークエンシングを行なう事によって解読した。シークエンシングは DNA シークエンサ (アロカ社 L1 -C O R 4 2 0 0 L (S) -2) を用い、試薬はサーモシークエンスキット (アマシヤム・ファルマシア US 7 8 5 0 0) を使用し、ダイデオキシ法にておこなった。

重鎖、軽鎖のシークエンスプライマーは以下のものを使用した。

重鎖 : T 7 Promoter IDR700 ダイラベルプライマー 50  $\mu$  l

5' TAATACgACTCACTATAggg3' (20mer) (配列番号 : 9 7)

軽鎖 : カスタム・プライマー 3' huCH1J

IDR800 ダイラベルプライマー 50  $\mu$  l

5' ATTAATAAgAgCTATCCCgg3' (20mer) (配列番号 : 9 8)

遺伝子の塩基配列解読の結果、配列の欠失が生じていないものの数は表 1 1 に示した。また、株特異的なクローンの遺伝子およびアミノ酸配列については、配

列表に示した。

#### 7-5-4 インフルエンザウイルス中和試験

MDCK 細胞を 96 ウェル平底プレート（コーニング社 cat#3596）の各ウェルに（約  $10^4$  cells/well）分注し、CO<sub>2</sub> インキュベータにてウェルの底にモノレイヤーシートを形成するように 37°C で培養した。次の日 0.2% BSA (fraction V, Sigma Chemical Co.) を含む MEM 培地により 96well 丸底プレートの各ウェル内に試験する各抗体を 4 倍希釈して入れた。0.2% BSA を含む MEM 培地により希釈したインフルエンザウイルス液 ( $4 \times 10^4$  FFU/mL) 25  $\mu$ l と、希釈した抗体あるいはコントロールの溶液 25  $\mu$ l を混合し、37°C 60min 反応させた。

それらの混合液を先に述べた 96 穴プレート中の MDCK 細胞に 25  $\mu$ l 添加し、37°C 60min. 保温することにより、ウイルスを細胞に吸着させた。

吸着後 PBS で洗浄し 100  $\mu$ L/well の 0.5% tragacanth gum と 5  $\mu$ g/ml のトリプシンを含む MEM 培地を添加し、さらに 37°C 24 時間培養した。

培養後、PBS でウェルを洗浄した後、100%エタノールをウェルに添加し、室温 10 分処理し、ウェルをヘアドライヤーで乾燥させた。PAP 染色後 Focus を計数した。

抗体の中和能の強さは、何も入れない場合（陽性コントロール）からのフォーカスの減少率で表わされる。

以下の表 13 に示すように Fab 型抗体クローン番号 NC1、SY39 および SY47 は有為なインフルエンザウイルスに対する中和活性を示した。

- 8 7 -

表 1 3

クローン番号 (希釈倍数)	ニューカレドニア株 (H1N1)		シドニー株 (H3N2)	
	ウイルス力価 (FFU/well)	フォーカス 減少率 (%)	ウイルス力価 (FFU/well)	フォーカス 減少率 (%)
NC1 (1:1)	26	71.3	ND	
SY39 (1:1)	ND		3	94.9
SY47 (1:1)	ND		12.5	78.6
IF8 (1:1)	71	21.5	66	0
*AS1296 (1:100)	43.5	51.9	1	98.3
*C179 (1:100)	12.5	98.3	ND	
*a-AichH3 (1:100)	ND		2.5	95.7
陽性コントロール	90.5	0	58.5	0

FFU : Focus Forming Unit ND : Not Done \*中和活性を持つことが既知の抗体

$$\text{フォーカス減少率}(\%) = \frac{\text{陽性コントロール力価} - \text{サンプルのウイルス力価}}{\text{陽性コントロール力価}} \times 100$$

(力価:FFU/well)

#### 7-5-5 評価の結論

予測した通りにウイルス株に特異的なファージクローンはインフルエンザウイルスを中和する高い活性を有していた。すなわちニューカレドニア株 (H1N1) に対するクローン NC1 またはシドニー株 (H3N2) に対するクローン SY39、およびクローン SY47 である。これらファージクローンが有する重鎖と軽鎖の塩基配列、およびこの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を以下の配列番号として記載する。

クローン番号	重鎖	軽鎖
NC1 (塩基配列)	6 7	6 8
NC1 (アミノ酸配列)	8 5	8 6
SY39 (塩基配列)	6 9	7 0
SY39 (アミノ酸配列)	8 7	8 8
SY47 (塩基配列)	7 1	7 2
SY47 (アミノ酸配列)	8 9	9 0



これらの可変領域を実際に医療用に使用するにあたっては、抗体遺伝子が得られている特性を生かし、完全イムノグロブリン型への変換や酵素の結合なども比較的簡単に実施することができると考えられる。また、突然変異を人工的に起こすことによってより活性を上昇させることができると期待される。

## 8. ファージライブラリーからの特定の抗原に特異的に結合するファージの選択－4

抗原として水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) 由来の抗原を用い、本発明による抗体ライブラリーから、抗体のスクリーニングを試みた。

### 8-1 VZV に反応性を持つファージ抗体の単離

#### 8-1-1 スクリーニング用試験管の作製

公的機関で入手可能である VZV の感染したヒト胎児肺細胞 (HEL) を PBS 中で超音波処理によって破碎し、Shiraki et al (1982) (Shiraki K, Takahashi M J Gen Virol 1982, 61 : 271-5) に従い gE と gH タンパク質を調製し、そのうち gH タンパク質を 25  $\mu$ g/ml の濃度に調整し VZV 抗原溶液とした。VZV 抗原溶液をイムノチューブ (Maxisorp) に 4.5ml 入れて 4℃18 時間あるいは 25℃2 時間、穏やかに転倒混和して VZV 抗原をイムノチューブ内表面に結合させた。VZV 抗原溶液を除いたのち、2% の濃度で PBS に解かしたスキムミルクを 4.5ml チューブに入れ、4℃で 18 時間あるいは 25℃で 1 時間反応させ非特異的反応を防ぐブロッキング処理を行なった。

#### 8-1-2 スクリーニング操作

上記のようにして作製した抗原結合済みのイムノチューブに 2% スキムミルク in PBS に懸濁した AIMS4 ファージライブラリー 4.5mL を入れ、25℃で 2 時間転倒混和して反応させ、チューブ上に結合した VZV 抗原と AIMS4 ファージライブラリーを接触させた。

- 89 -

上記の接触が終わったのち、ファージ懸濁液を除き、以下の表に示す緩衝液で表 1 4 に示す回数洗浄し（洗浄とは緩衝液をチューブに入れ転倒混和した後、排出することを指す）、チューブに結合しているファージ以外のファージを取り除いた。

表 1 4

	洗浄	input	output	in/out
1 <sup>st</sup>	2%skim-PBS 4 回+ PBS 1 回	$1.3 \times 10^{14}$	$1.4 \times 10^9$	$9.6 \times 10^4$
2 <sup>nd</sup>	2%skim-PBS 5 回+ PBS 15 回	$3.1 \times 10^{13}$	$9.3 \times 10^4$	$3.3 \times 10^8$
3 <sup>rd</sup>	2%skim-PBS 5 回+ PBS 20 回	$4.6 \times 10^{13}$	$3.6 \times 10^6$	$1.3 \times 10^7$
4 <sup>th</sup>	2%skim-PBS 5 回+ PBS 20 回	$5.0 \times 10^{13}$	$2.5 \times 10^8$	$2.0 \times 10^5$

次に 0.1M トリエチルアミン pH12.3 を 4.5ml チューブに添加し、20 分室温で転倒混和して、ファージをチューブから乖離させて別の新たなチューブに移し、直ちに 1M Tris-HCl pH6.8 を 1.1ml 加えて中和した。

7-2-3 と同様に回収したファージの増幅工程を行ない、増幅後回収したファージ液の力価を 7-3-3 と同様に測定した。

以上のスクリーニングを 3 回繰返した。

## 8-2 結合活性を大腸菌の培養上清を用いて ELISA 法により確認する工程

7-5-2 と同様に ELISA 法を用いて結合活性の確認を行なった。VZV 抗原を PBS 中で  $12.5 \mu\text{g/ml}$  の濃度で溶かし  $100 \mu\text{l/well}$  96well プレーートの各ウェルに添加し、 $4^\circ\text{C}$ 18 時間保温し、96 ウェルプレートに抗原を結合させた。次に、2.5% BSA を  $200 \mu\text{l/well}$  加え、 $4^\circ\text{C}$ 18 時間保温することによりブロッキングした。

ブロッキングの終了した 96well プレーートのブロッキング液をすて、PBS で一回洗ったのち、8-5-2 と同様の手順で調製したファージが感染した大腸菌の培養上清を  $100 \mu\text{l/well}$  加え、 $25^\circ\text{C}$ 1 時間で反応させた。これ以降の過程は 8-5-2 と同様に実施した。

上記の表に示すように、3 回目のスクリーニング操作にて回収率(output)の上

- 90 -

昇が見られたため、12 クローンについて **ELISA** を行ったところ活性の強い 1 クローンを得た。そのまま、4 回目のスクリーニングを行って 48 クローンにつき **ELISA** を行ったところ、活性は弱い陽性であった。

### 8-3 gE と gH の反応性の比較とシーケンシング

糖鎖に対する抗体はウイルスの他の部分にも反応し、特異性が低く、中和活性も低いことが予測された。そこで、豊富な糖蛋白を持つ **gE** に対する **ELISA** も実施し、**gE** に高い反応性を持つ抗体は検討から除くこととした。

この基準により、**gH** の活性が高い 29 クローン (表 1 5) を選択し、7-5-3 と同様に塩基配列を解析 (シーケンシング) した。シーケンシングによって 16 種類の塩基配列が確認された。それぞれ代表的なクローンにつき培養上清を取り、飽和硫酸による濃縮、透析の後、中和活性の試験を実施した。

表 1 5

シーケンス タイプ	クローン名	ELISA による gH と gE の 結合力の比較
1	<b>VZ9</b>	$gH \leq gE$ 低
2	<b>VZ10, VZ34, VZ75</b>	$gH > gE$ 低
3	<b>VZ11</b>	$gH > > gE$
4	<b>VZ13, VZ15, VZ19</b>	$gH < gE$
5	<b>VZ24</b>	$gH > gE$ 低
6	<b>VZ36</b>	$gH \leq gE$ 高
7	<b>VZ49, VZ66</b>	$gH = gE$
8	<b>VZ60, VZ76</b>	$gH > gE$ 低
9	<b>VZ64, VZ33, VZ58</b>	$gH \geq gE$
10	<b>VZ68</b>	$gH < gE$
11	<b>VZ77</b>	$gH > gE$ 低
12	<b>VZ85</b>	$gH < gE$
13	<b>VZ86, VZ96</b>	$gH \geq gE$ 低
14	<b>VZ89, VZ80, VZ81</b>	$gH = gE$ 低
15	<b>VZ94, VZ62</b>	$gH > gE$ 低
16	<b>VZ100</b>	$gH \geq gE$
17	<b>VZ102</b>	$gH > gE$ 低

下線：中和活性を検定したクローン、太字斜体：強い中和活性を認めたクローン

#### 8-4 得られた抗体の VZV ウイルス中和試験

##### 8-4-1 試験に用いる cell-free 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV 岡株) の作製

ヒト胎児肺細胞 (HEL) の培養細胞の約 50% に感染細胞特有の変化 (CPE : cytopathic effect) を認めたときに, EDTA (0.04—0.1%) を含む PBS (トリプシンは使用しない) によって細胞を回収し、低速遠心により細胞を集め、SPGC 保存液 (5% sucrose, 0.1%, Na-グルタミン酸含有滅菌 PBS に牛胎児血清を 10% 添加したもの) に懸濁した。

超音波または、凍結融解+超音波にて、細胞を破碎して細胞内のウイルスを遊離させ、3000 rpm, 10 分の遠心上清をウイルス液とし、-85℃で保存した。一部を HEL 細胞にて感染力価を測定した。すなわち、ウイルス液を SPGC 保存液で適度に希釈し、HEL 細胞に 0.2ml をあらかじめ用意された 6cm シャーレの HEL 細胞に振り掛けることにより接種した。HEL 表面が乾かないように、ウイルス液が全体に均一になるように何度も細胞表面をウイルス液で覆うように液を往復させながら 1 時間感染させた。感染後培養液を入れて 4—6 日間培養し、その後培養液を除き、定法に従って 5%ホルマリンで細胞を固定し、メチレンブルー染色し、実体顕微鏡下でブラック数を測定した。単位溶液あたりのブラック数を (PFU/ml) として感染力のあるウイルスの指標 (力価) とした。

##### 8-4-2 中和能試験

上記で作製したウイルス液を SPGC 保存液で希釈して、100PFU/0.1ml とした。希釈したウイルス液と SPGC で 10 倍希釈した抗体溶液を 0.3ml ずつ混合し、37 度で 1 時間反応させた。その中から、0.2ml をあらかじめ用意された 6cm シャーレの HEL 細胞に振り掛けることにより接種した。HEL 表面が乾かないように、ウイルス液が全体に均一になるように何度も細胞表面をウイルス液で覆うように液を往復させながら 1 時間感染させた。

感染後培養液を 5ml 入れて 4—6 日間培養した。培養後、培養液を除き、定法に従って 5%ホルマリンで細胞を固定し、メチレンブルー染色し、実体顕微鏡

- 92 -

下でブラック数を測定した。

抗体なし（PBSのみ）で形成されるブラック数を対照として、抗体によってどれだけブラック数が減少できるかによって、抗体のウイルス中和活性を測定した。以下の表 16 のように、No.10, 24, 94 に強い中和活性が見られた。

表 16

抗体 クローン名	中和試験ブラック数				中和活性
	試験 1 回目	試験 2 回目	3 回目	4 回目	
コントロール (PBS)	42	46,	48,	50	
VZ9	*				
VZ10	0	0			+++
VZ11	30	25			+-
VZ13	47	48			-
VZ24	0	0			+++
VZ36	14	15			+
VZ49	40	43			-
VZ60	15	9			+
VZ64	41	42			-
VZ77	36	*			
VZ86	46	50			-
VZ89	32	33			+-
VZ94	1	2			++
VZ100	29	28			+-
VZ102	19	24			+-

中和活性：非常に強い・・・+++、強い・・・++、明らかに見られる・・・+、

判断保留・・・+-、無し・・・-

\*：微生物感染のため計測不能。

#### 8-4-3 中和試験の結論

本発明により、ブラック形成を非常に高い効率で抑制したファージクローンが 3 つ得られた。すなわち、VZ10 と VZ24 と VZ94 である。これらファージクローンが有する重鎖と軽鎖の塩基配列、およびこの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を以下の配列番号として記載する。

- 93 -

クローン番号	重鎖	軽鎖
VZ10 (塩基配列)	7 3	7 4
VZ10 (アミノ酸配列)	9 1	9 2
VZ24 (塩基配列)	7 5	7 6
VZ24 (アミノ酸配列)	9 3	9 4
VZ94 (塩基配列)	7 7	7 8
VZ94 (アミノ酸配列)	9 5	9 6

これらは、異なる塩基配列をもち、実際に医療用に使用する場合には、その中和活性が相乗的に作用する可能性がある。実際の使用にあたっては、抗体遺伝子が得られている特性を生かし、定常領域を備えた完全なイムノグロブリン分子への変換や酵素の結合なども比較的簡単に実施することができる。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によって、機能的なコンフォーメーションを維持した抗体分子を高い割合で含む抗体ライブラリー、あるいはそれをコードする遺伝子のライブラリーの提供が可能となった。本発明による遺伝子ライブラリーは、まず重鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成することができる軽鎖可変領域をコードする遺伝子の選択に始まる。こうして選択された軽鎖可変領域遺伝子に、重鎖可変領域遺伝子を組み合わせることによって構成された本発明による遺伝子ライブラリーからは、機能的な抗体からなる抗体レパトリーの再現が可能である。機能的な抗体分子の選択工程を経て生成される本発明の抗体ライブラリーは、生体内における抗体レパトリーを *in vitro* で再現したものと言うこともできる。

本発明による遺伝子ライブラリーは、機能的な抗体を高い割合で含む抗体ライブラリーを生成することができる。このような抗体ライブラリーを用いれば、機能的な抗体を効率的にスクリーニングすることができる。公知の抗体ライブラリーが、単に多様性の追求にとどまっていたのに対して、本発明はライブラリーを

構成する抗体の質に着目し、その質を高める手段を確立した。この点において、本発明は *in vitro* における抗体ライブラリーの構築と、抗体のスクリーニング方法に、まったく新たな視点を与える。

本発明によって得られる抗体ライブラリーにおいては、重鎖の多様性を十分に生かすことができる。この利点は、単に生体内の抗体の多様性を *in vitro* で維持できるということにとどまらない。本発明に基づけば、たとえば error-prone PCR のような人為的な変異の導入方法のメリットを最大限に生かすことができる。すなわち本発明においては、変異を与えた重鎖の多様性は、理論的には完全に抗体の多様性として再構成される。なぜならば、重鎖との機能的な再構成が可能な軽鎖が選択されているからである。公知のライブラリーにおいては、軽鎖が機能的な抗体分子を再構成できないものである場合には、有意義な重鎖の変異が抗体活性の発現に至らず、スクリーニングすることができないのと対称的である。

## 請求の範囲

1. 以下の工程を含む、イムノグロブリンの軽鎖可変領域遺伝子と重鎖可変領域遺伝子の組み合わせからなる遺伝子ライブラリーの調製方法。
  - a) 軽鎖可変領域遺伝子として、重鎖可変領域遺伝子の発現産物との機能的なコンフォーメーションの再構成が可能な軽鎖分子をコードするものを選択し、
  - b) 工程 a) によって得られる軽鎖可変領域遺伝子の集合である遺伝子のライブラリーを調製し、
  - c) 工程 b) のライブラリーに重鎖可変領域をコードする遺伝子のライブラリーを組み合わせる
2. 工程 c) において、VH ファミリーごとにそれぞれ独立して調製した重鎖可変領域遺伝子のライブラリーを、生体内における VH ファミリーの割合に応じて組み合わせる請求項 1 に記載の方法。
3. 工程 c) における遺伝子ライブラリーの組み合わせを同一のベクター上で行う請求項 1 に記載の方法。
4. 更に次の工程 d) を含む、請求項 1 に記載の方法。
  - d) 重鎖可変領域に標識ペプチドが融合しており、この標識ペプチドを指標として重鎖を発現するクローンを選択する工程
5. 請求項 1 に記載の方法によって得ることができる遺伝子ライブラリー。
6. 少なくともイムノグロブリンの軽鎖可変領域をコードする遺伝子からなる遺伝子ライブラリーであって、イムノグロブリンの重鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成できない軽鎖可変領域をコードする遺伝子が実質的に排除されている遺伝子ライブラリー。
7. ライブラリーが重鎖可変領域をコードする遺伝子のライブラリーを伴っている請求項 6 に記載のライブラリー。



8. VH ファミリーのそれぞれの重鎖可変領域遺伝子のライブラリーが、生体内の多様性を包含するのに十分なクローン数を有する請求項 7 に記載のライブラリー。
9. ライブラリーを構成する遺伝子が、細菌、酵母、および植物細胞からなる群から選択されるいずれかの宿主細胞に導入されたものである請求項 6 に記載のライブラリー。
10. ライブラリーを構成する遺伝子が、哺乳動物細胞に導入されたものである請求項 6 に記載のライブラリー。
11. ライブラリーを構成する少なくとも一部の遺伝子が、繊維状ファージに組み込まれている請求項 6 に記載のライブラリー。
12. ライブラリーを構成する遺伝子によってコードされる重鎖可変領域と軽鎖可変領域の断片を繊維状ファージ表面に発現し、かつそれらが機能的に再構成されている請求項 11 に記載のライブラリー。
13. 重鎖可変領域に標識ペプチドをコードする遺伝子が融合されている請求項 12 に記載のライブラリー。
14. イムノグロブリン軽鎖可変領域遺伝子がヒトに由来するものである請求項 6 に記載のライブラリー。
15. イムノグロブリン軽鎖超可変部位がシステイン残基を含まないアミノ酸配列からなる請求項 14 に記載のライブラリー。
16. 請求項 5 に記載の遺伝子ライブラリーを構成する各クローンが、そのクローンによって保持される遺伝子によってコードされる抗体タンパク質を伴っている rgdp ライブラリー。
17. 請求項 5 に記載の遺伝子ライブラリーを構成する各クローンについて、そのクローンによって保持される遺伝子によってコードされる抗体タンパク質から構成される抗体ライブラリー。
18. 次の工程を含む、重鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成

- 97 -

することができる軽鎖可変領域をコードする遺伝子の選択方法。

- a) 軽鎖可変領域をコードする、1つまたは複数の遺伝子を取得する工程、
- b) 軽鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを構成することが確認されているイムノグロブリン重鎖可変領域をコードする遺伝子を取得する工程、
- c) 工程 a) によって得られた軽鎖可変領域をコードする遺伝子の任意の1つを選択し、工程 b) で取得した重鎖可変領域をコードする遺伝子とイムノグロブリンの機能的なコンフォーメーションを再構成が可能な条件下でタンパク質に翻訳する工程、
- d) 工程 c) において翻訳されたタンパク質の抗原結合領域の形成を検出する工程、および
- e) 抗原結合領域の形成が検出されたタンパク質を構成する軽鎖可変領域をコードする遺伝子を選択する工程

19. 更に、次の工程 f) を含む請求項 18 に記載の方法。

- f) 軽鎖可変領域遺伝子の塩基配列を決定し、その塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を比較して同一のアミノ酸配列をコードする遺伝子、およびアミノ酸の欠損を生じている遺伝子を排除する工程

20. イムノグロブリンの軽鎖可変領域が、繊維状ファージの表面に発現している請求項 18 に記載の方法。

21. イムノグロブリンの軽鎖可変領域をコードする遺伝子と重鎖可変領域をコードする遺伝子が挿入されたファージミドを感染させた宿主微生物の培養上清そのものを、工程 c) のための軽鎖を含む試料として利用する請求項 18 に記載の方法。

22. 次の工程を含む、特定の抗原と結合するイムノグロブリン可変領域の検出方法。

- a) 請求項 5 または請求項 7 に記載のライブラリー、またはその発現産物と、該抗原とを抗原抗体反応に適した条件下に接触させる工程

- 98 -

b) 該抗原とイムノグロブリン可変領域との結合を検出する工程

23. ライブラリーが請求項12に記載のライブラリーである請求項22に記載の方法。

24. 請求項22に記載の方法の後、更に次の工程c)を行うことを特徴とする、特定の抗原と結合するイムノグロブリン可変領域の取得方法。

c) 前記抗原と結合するイムノグロブリン可変領域を発現するクローンを選択する工程

25. 更に次の工程d) - e)を含む請求項24に記載の方法。

d) 工程c)で選択したファージクローンを増幅して2次的なライブラリーを得る工程、

e) 工程c)において選択されるクローンの回収率が上昇するまで、2次的なライブラリーについて、工程a) - d)を繰り返す工程

26. 請求項24に記載の方法によって得られたクローン、またはイムノグロブリン断片、もしくはそれをコードする遺伝子。

27. 配列番号：61～配列番号：78のいずれかに記載の塩基配列を含む、ポリヌクレオチド。

28. 配列番号：79～配列番号：96のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む蛋白質。

29. 次の要素からなる抗体ライブラリーの調製用キット。

a) 重鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成することができない軽鎖可変領域をコードする遺伝子を実質的に排除した軽鎖可変領域遺伝子ライブラリー、および

b) 重鎖可変領域をコードする遺伝子を増幅することができるプライマーセット

30. 以下の工程からなる抗体ライブラリーの調製方法。

a) ファージミドに、イムノグロブリンの少なくとも可変領域を含む領域を

- 9 9 -

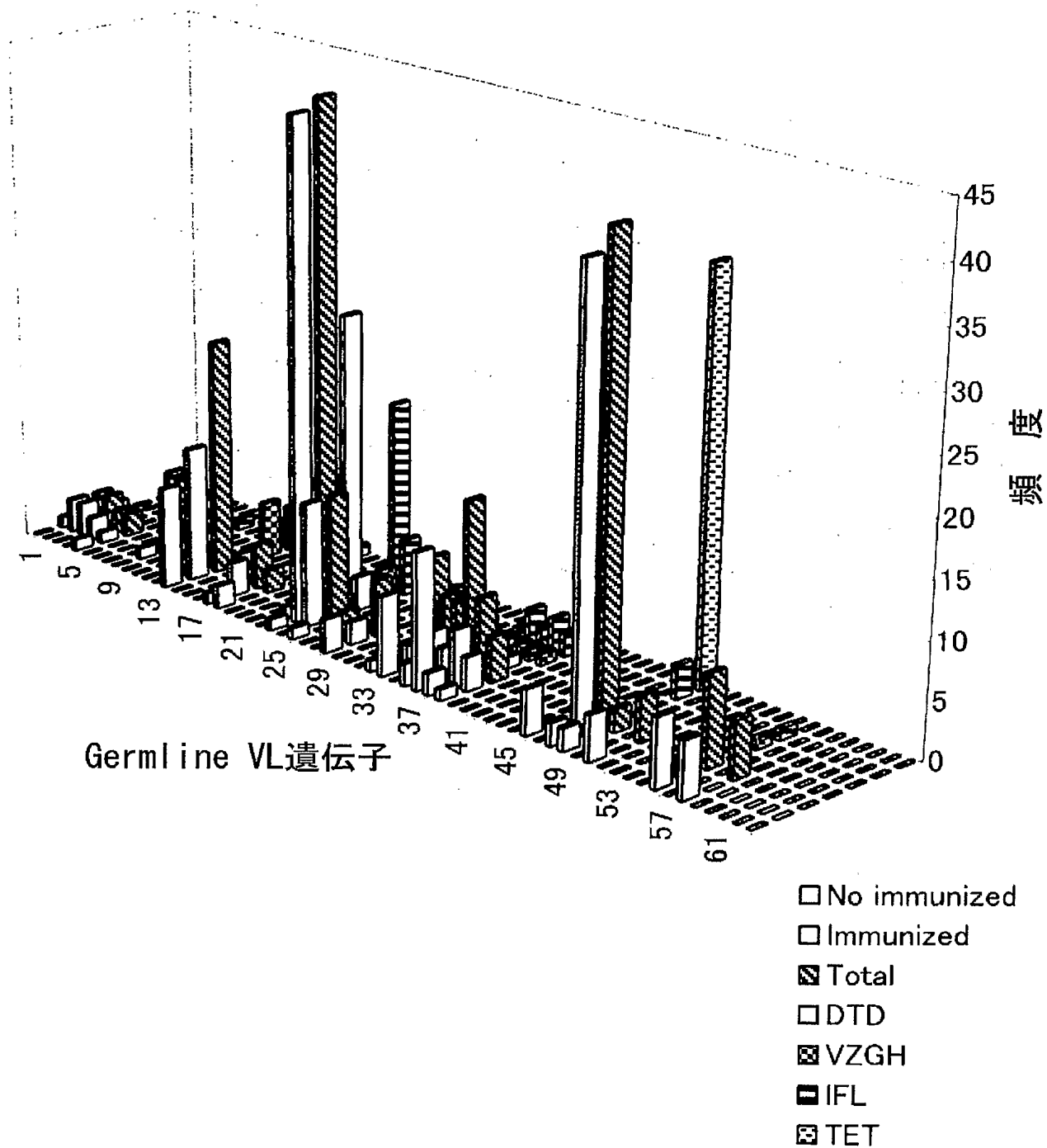
コードする遺伝子を組み込む工程

b) 工程 a) で得られたファージミドを宿主微生物に感染させる工程

c) ヘルパーファージを感染させることなく、工程 b) の宿主微生物の培養上清を回収して抗体ライブラリーとする工程

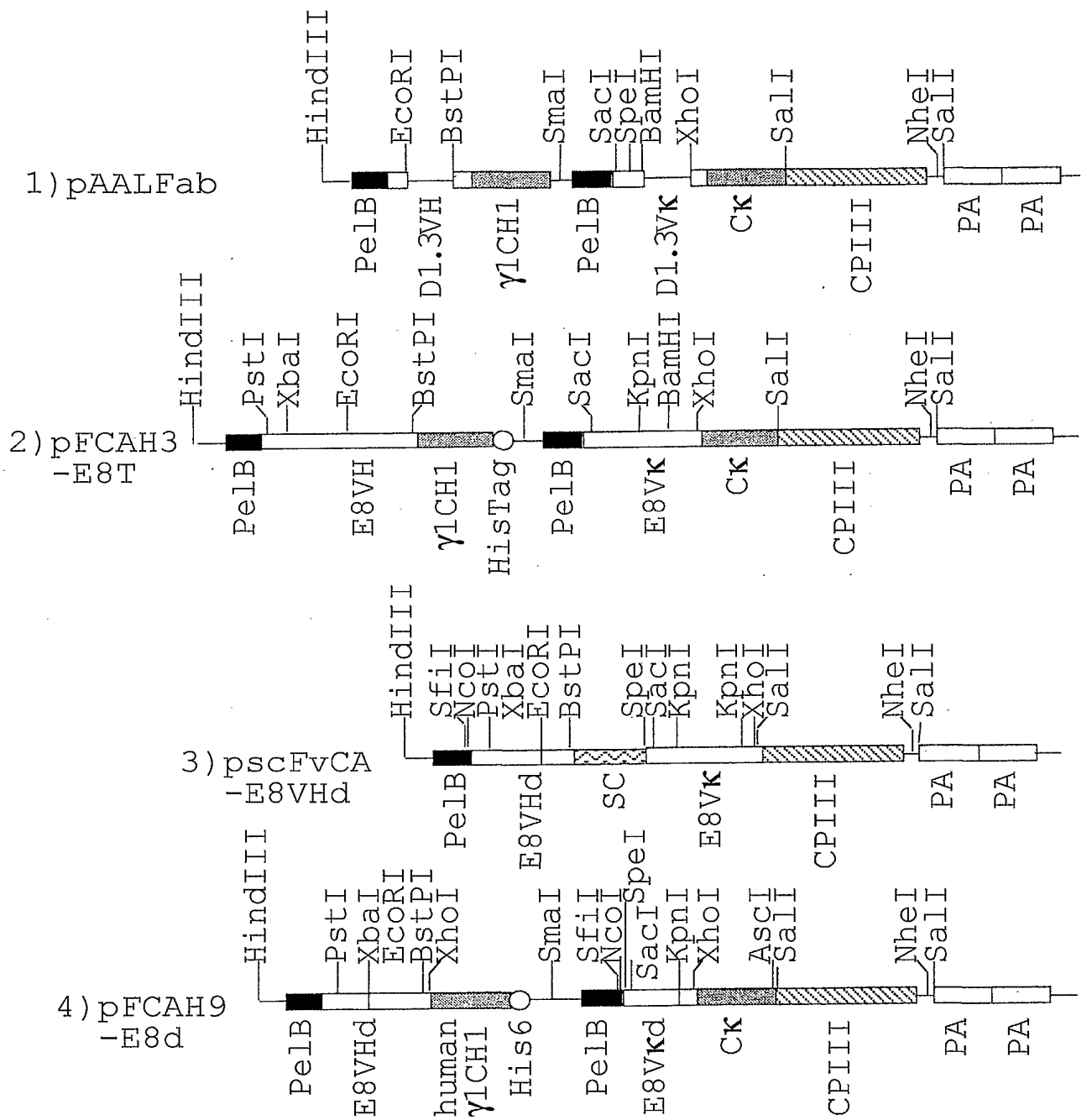
1 / 1 1

図 1



2 / 1 1

図 2



3 / 1 1

☒ 3

AAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA  
TTGTTATTACTCGCTGCCCCAACCAGCGATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAG  
CCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTG  
AAGCAGAGGCCTGAAAAGGGTCTAGAATTCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTA  
TGATTACGGCAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCC  
ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA  
GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC  
GGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGTACCGTGCCTTCCAGCAGCTTGGGCAC  
CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATC  
TTGTCATCACCATCATCACCATTAATAAGAGCTATCCCGGGAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGAC  
AGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGC  
CACTAGTGACATCGAGCTCACCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGCGTCTGTGGGAGAACTGTCAACATCAC  
ATGTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATTTAGCATGGTACCAAGCTCGAGATCAAACGGGCTGATGCTG  
CACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCCTCAGTCGTGTGCTTCT  
TGAACAGCTTCTACCCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCC  
TGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGG  
ACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGA  
GCTTCAACAGGAATGAGTGTTCGGCGCGCCAGTCGACTCCATTCTGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTG  
ACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTG  
GCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTG  
ATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTAC  
AGTCAGACGCTAAAGGCAAACTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGTCTATCGATGGTTTCATTGGTG  
ACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAG  
TCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTG  
AATGTGCCCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTAT  
TCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATAC  
TGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTTGGGTGCTAGCTGTGCGACTGCGCAACACGATGAAGCC  
GTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAA  
GAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCT  
AAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTAT  
GAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCA  
AGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAAT  
TAGCTGGGAATTAATTC

4 / 11

☒ 4

M K Y L L P T A A A G  
 AAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA  
*HindIII*  
 L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L V K  
 TTGTTATTACTCGCTGCCCCAACCAGCGATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAG  
*PstI*  
 P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y M H W V  
 CCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTG  
 K Q R P E K G ----- L T S E D T A V Y Y C A G Y  
 AAGCAGAGGCCTGAAAAGGGTCTAGAATTCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTA  
*XbaI EcoRI*  
 D Y G N F D Y W G Q G T T V T V S S A S T K G P  
 TGATTACGGCAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCC  
*BstPI XhoI*  
 S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K  
 ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA  
 D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P  
 GGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC  
 A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T  
 GGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC  
 Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S  
 CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC  
 C H H H H H H \* \*  
 TTGTCATCACCATCATCACCATTAATAAGAGCTATCCCGGGAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGAC  
*SmaI*  
 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A  
 AGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGC  
*SfiI NcoI*  
 T S D I E L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T  
 CACTAGTGACATCGAGCTCAGCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGCGTCTGTGGGAGAACTGTCACCATCAC  
*SpeI SacI*  
 C R A S G N I H N Y L A ----- K L E I K R A D A A  
 ATGTCGAGCAAGTGGGAATATTACAAATTATTTAGCATGGTACCAAGCTCGAGATCAAACGGGCTGATGCTG  
*KpnI XhoI*



5 / 11

図 5

P T V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F L  
CACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCT

N S F Y P K D I N V K W K I D G S E R Q N G V L  
TGAACAGCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCC

N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D  
TGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGG

E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S  
ACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGA

F N R N E C S A R Q S T P F V C E Y Q G Q S S D  
GCTTCAACAGGAATGAGTGTTCGGCGCGCCAGTCGACTCCATTGCTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTG

L P Q P P V N A G G G S G G G S G G G S E G G G  
ACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTG

S E G G G S E G G G S E G G G S G G G S G S G D  
GCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCGGTG

F D Y E K M A N A N K G A M T E N A D E N A L Q  
ATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTAC

S D A K G K L D S V A T D Y G A A I D G F I G D  
AGTCAGACGCTAAAGGCCAACTTGATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTG

V S G L A N G N G A T G D F A G S N S Q M A Q V  
ACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATCCCAAATGGCTCAAG

G D G D N S P L M N N F R Q Y L P S L P Q S V E  
TCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTG

C R P F V F G A G K P Y E F S I D C D K I N L F  
AATGTCGCCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTAT

R G V F A F L L Y V A T F M Y V F S T F A N I L  
TCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATAC

R N K E S \* S T A Q H D E A  
TGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTTGGGTGCTAGCTGTCGACTGCGCAACACGATGAAGCC

V D N K F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E  
GTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAACAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAA

E Q R N A F I Q S L K D D P S Q S A N L L A E A  
GAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCT

K K L N D A Q A P K V D N K F N K E Q Q N A F Y  
AAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAACAAACGCGTTCTAT

$6/11$ 

图 6

E I L H L P N L N E E Q R N A F I Q S L K D D P  
GAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCA  
S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K V D A N  
AGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAAT  
\*  
TAGCTGGGAATTAATTC

図 7

AAGCTTGCATGCAAATTCCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA  
TTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAG  
CCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTG  
AAGCAGAGGCCTGAAAAGGGTCTAGAATTCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTA  
TGATTACGGCAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGTGGCGGATCAGG  
TGGCGGTGGAAGTGGCGGTGGTGGGTCTACTAGTGACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGC  
GTCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATTTAGCATGGTACCA  
GCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAG  
GTTCAGTGGCAGTGGATCCGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAG  
TTATTACTGTCAACATTTTTGGAGTACTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGTACCAAGCTCGAGTCGACTCCATT  
CGTTTGTGAATATCAAGGCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGG  
TGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGG  
CGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTAT  
GACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCAGACGCTAAAGGCAAACTTGATTCTGTGCTACTGATTA  
CGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTT  
TGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCA  
ATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTGCCCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATT  
TTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCGGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTAT  
GTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTCTTTTTGGGTGCT  
AGCTGTCGACTGCGCAACACGATGAAGCCGTAGACAACAAATTCACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATG  
AGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAA  
GCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACAACAAAT  
GAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCA  
TCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATG  
ATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAATTAGCTGGGAATTAATTC

8 / 11

☒ 8

M K Y L L P T A A A G  
AAGCTTGCATGCAAATTCCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA  
*HindIII*

L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L V K  
TTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAG  
*SfiI NcoI PstI*

P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y M H W V  
CCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTG

K Q R P E K G ----- L T S E D T A V Y Y C A G Y  
AAGCAGAGGCCTGAAAAGGGTCTAGAATTCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTA  
*XbaI EcoRI*

D Y G N F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G  
TGATTACGGCAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGTGGCGGATCAGG  
*BstPI*

G G G S G G G G S T S D I E L T Q S P A S L S A  
TGGCGGTGGAAGTGGCGGTGGTGGGTCTACTAGTGACATCGAGCTCACCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGC  
*SpeI SacI*

S V G E T V T I T C R A S G N I H N Y L A W Y Q  
GTCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGGGAATATTACAATTATTTAGCATGGTACCA  
*KpnI*

Q K P G K S P Q L L V Y N A K T L A D G V P S R  
GCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAG

F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q P E D F G S  
GTTCAGTGGCAGTGGATCCGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAG  
*BamHI*

Y Y C Q H F W S T P W T F G G G T K I E S T P F  
TTATTACTGTCAACATTTTTGGAGTACTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGTACCAAGCTCGAGTCGACTCCATT  
*KpnI XhoI SalI*

V C E Y Q G Q S S D L P Q P P V N A G G G S G G  
CGTTTGTGAATATCAAGGCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGG

G S G G G S E G G G S E G G G S E G G G S E G G  
TGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGG

G S G G G S G S G D F D Y E K M A N A N K G A M  
CGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTAT

T E N A D E N A L Q S D A K G K L D S V A T D Y  
GACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCAGACGCTAAAGGCAAACCTTGATTCTGTCGCTACTGATTA

9 / 11

☒ 9

G A A I D G F I G D V S G L A N G N G A T G D F  
CGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATT  
A G S N S Q M A Q V G D G D N S P L M N N F R Q  
TGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCA  
Y L P S L P Q S V E C R P F V F G A G K P Y E F  
ATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATT  
S I D C D K I N L F R G V F A F L L Y V A T F M  
TTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCGGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTAT  
Y V F S T F A N I L R N K E S \*  
GTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTTGGGTGCT  
NheI  
S T A Q H D E A V D N K F N K E Q Q N A F Y E  
AGCTGTCGACTGCGCAACACGATGAAGCCGTAGACAACAAATCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATG  
SalI  
I L H L P N L N E E Q R N A F I Q S L K D D P S  
AGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAA  
Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K V D N K F  
GCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACAACAAAT  
N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E E Q R N A  
GAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCA  
F I Q S L K D D P S Q S A N L L A E A K K L N D  
TCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATG  
A Q A P K V D A N \*  
ATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAATTAGCTGGGAATTAATTC

10/11

☒ 10

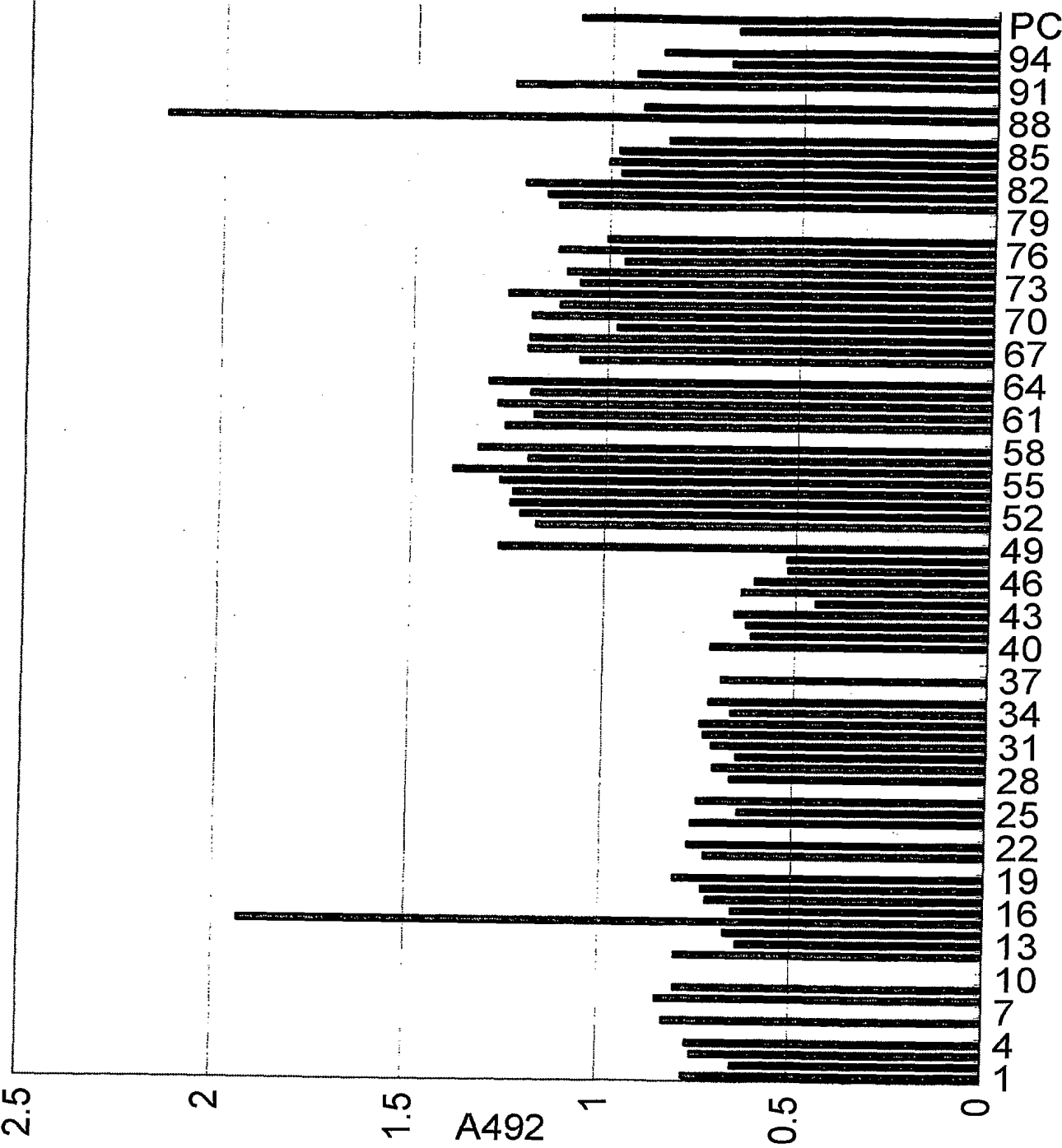
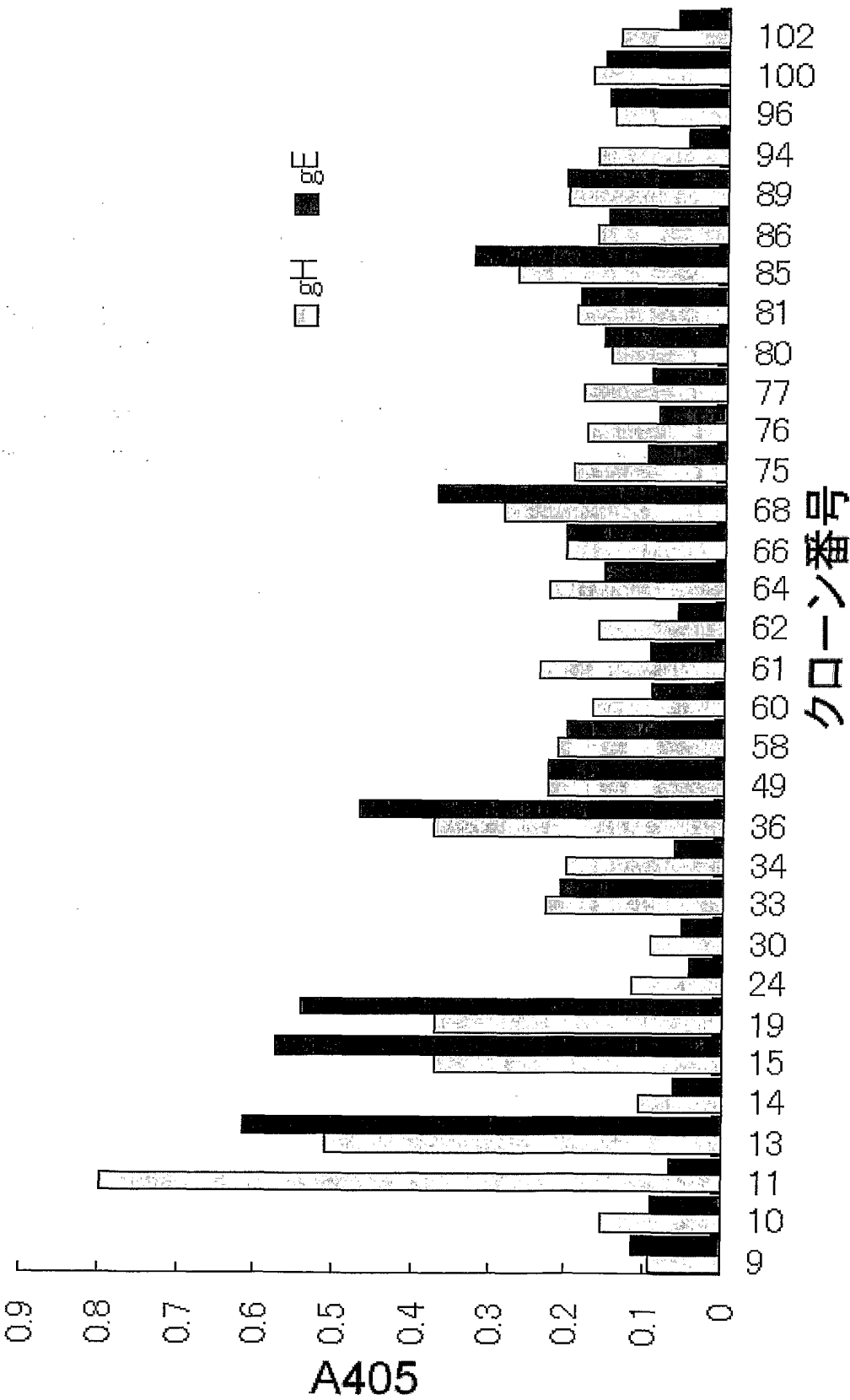


図 11



## SEQUENCE LISTING

<110> Medical & Biological Laboratories Co., Ltd

<120> Antibody Library

<130> M3-108PCT

<140>

<141>

<150> JP 2000-50543

<151> 2000-02-22

<160> 98

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15



2/63

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20

25

30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Lys Gly Pro Ser Gly Ser Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

3/63

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

caggaaacag ctatgac

17

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

cggctccaag tcgacgtcgt ca

22

<210> 4

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

4/63

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 4

cagctgcagc agtctggggc agagcttggtg aagccagggg cctcagtcaa gttgtcctgc 60  
acagcttctg gcttcaacat taa 83

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 81

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 5

agaccgaagt tgtaatttct gtggatatac gtgaccact tcgtctccgg acttttccca 60  
gatctcacct aaccttccta a 81

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 84

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

5/63

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 6

aagggtctag agtggattgg aaggattgat cctgcgagtg gtaatactaa atatgacccg 60  
aaggacaagg ccactataac agca 84

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 66

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 7

ttcctgttcc ggtgatattg tcgtctgtgt aggaggttgt gtcggatgga tgtcgactta 60  
agggac 66

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 51

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

6/63

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 8

cagctgaatt ccctgacatc tgaggacact gccgtctatt actgtgctgg t 51

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 73

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 9

cagataatga cagaccaat actaatgccg ttgaaactga tgaccccggt tccgtggtgc 60  
cagtggcaca agg 73

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

7/63

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

ggttctctaa cagtagtggt agtagtggtta attattctcg atagggccct cgaa 54

<210> 11

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

gacatcgagc tcaccagtc tccagcctcc ctttctgcgt ctgtgggaga aactgtcacc 60  
atcacatgt 69

<210> 12

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

8/63

## Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 12

tgacagtggc agtgtacagc tcgttcaccc ttataagtgt taataaatcg taccatgggc 60  
gtc 63

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 13

gcatgggtacc agcagaaacc agggaaatct cctcagctcc tggtctat 48

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 81

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

9/63

&lt;400&gt; 14

ggagtcgagg accagatatt acgttttttg aatcgtctac cacacggtag ttccaagtca 60  
ccgtcaccta ggccttgtgt t 81

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 15

tcatgaggca cctgcaagcc acctccgtgg ttcgagctct agttt 45

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence



10/63

&lt;400&gt; 16

agtactccgt ggacgttcgg tggaggcacc aagctcgaga tcaaa

45

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 17

atcgacagct

10

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 18

aagccacctc catggttcga gctctagttt

30

11/63

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 19

tcgaagttgt ccttactcac aagccgcgcg gtcagctgag gtaa

44

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 55

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 20

accctgggtca ccgtctcctc agcctccacc aagggcccat cggtcttccc cctgg

55

&lt;210&gt; 21

12/63

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 21

gggagtcgtc gcagcactgg cacgggaggt cgtcgaa

37

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 22

ggactctact ccctcagcag cgtcgtgacc gtgccc

36

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 63

&lt;212&gt; DNA

13/63

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 23

gggtcgttgt ggttcacct gttctttcaa ctcgggttta gaacagtagt ggtagtagtg 60  
gta 63

<210> 24

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 24

gggtttagaa cagtagtggt agtagtggtta attattctcg atagggccct cgaacg 56

<210> 25

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

14/63

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 25

ggcaccacgg tcaccgtctc gagcgctcc acc

33

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 91

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 26

caccacggtc accgtctcct caggcgggtgg cggatcaggt ggcggtggaa gtggcgggtgg 60  
tgggtctact agtgacatcg agtcaccca g 91

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 91

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

15/63

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 27

gtggtgccag tggcagagga gtccgccacc gcctagtcca ccgccacctt caccgccacc 60  
accagatga tcactgtagc tcgagtgggt c 91

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 28

caggaaacag ctatgac 17

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

16/63

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 29

gacgccgggt cggccgtac cggctccaag tcgacgtcgt ca 42

<210> 30

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 30

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgacatcc agatgaccca gtctcc 56

<210> 31

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

17/63

&lt;400&gt; 31

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgatgttg tgatgactca gtctcc 56

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 32

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgaaattg tgttgacgca gtctcc 56

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 33



18/63

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgacatcg tgatgaccca gtctcc 56

<210> 34

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 34

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgaaacga cactcacgca gtctcc 56

<210> 35

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 35

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgaaattg tgctgactca gtctcc 56

19/63

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 36

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccagctctg tgttgacgca gccgcc 56

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 37

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccagctctg ccctgactca gcctgc 56

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 56

20/63

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 38

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcctcctatg tgctgactca gccacc 56

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 39

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcctcttctg agctgactca ggacce 56

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

21/63

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 40

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccacgtta tactgactca accgcc 56

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 41

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccaggctg tgctcactca gccgcc 56

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

22/63

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 42

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccaatTTta tgctgactca gccccca 56

<210> 43

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 43

tgcactggcg cgccgaacac tctcccctgt tgaagctctt tgtg 44

<210> 44

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

23/63

&lt;400&gt; 44

tcgactggcg cgccgaacat tctgtagggg ccactgtctt etc

43

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 45

attaataaga gctatcccg

20

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 46

24/63

atggagtcgg gaaggaagtc 20

<210> 47

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 47

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccaggtgc agctggtgca gtctgg 56

<210> 48

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 48

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccaggtca acttaaggga gtctgg 56

25/63

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 49

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgaggtgc agctggtgga gtctgg 56

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 50

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccaggtgc agctgcagga gtcggg 56

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 56



26/63

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 51

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccaggtgc agctgttgca gtcctgc 56

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 52

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccaggtac agctgcagca gtcagg 56

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 59

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

27/63

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 53

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccagrtca ccttgaagga gtctggtcc 59

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 54

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccaggtgc agctacagca gtgggg 56

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

28/63

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 55

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgaggtgc agctggtgca gtctgg 56

<210> 56

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 56

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccaggtgc agctggtgca atctgggtct 60  
gagt 64

<210> 57

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

29/63

## Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 57

ggtggaggca ctcgagacgg tgaccagggt gc

32

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 58

ggtggaggca ctcgagacgg tgaccattgt cc

32

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

30/63

&lt;400&gt; 59

ggtggaggca ctcgagacgg tgaccagggt tc 32

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 60

ggtggaggca ctcgagacgg tgaccgtggt cc 32

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 368

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 61

caggtagc tgcagcagtc aggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60  
acatgcactg tctctggttc ctccatcagt agttactact ggagttggat ccgacagccc 120  
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca atgggagcac caactacaac 180  
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtcgacacgt ccaagaagca gttctccctg 240

31/63

aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt attgtgcggg ccaaccgttt 300  
ttgcagaggt cactctatcc gggggcagtg tggcattggg gccagggaac cctggtcacc 360  
gtctcgag 368

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 354

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 62

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
tcttggttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg taaactggta ccagcagctc 120  
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcggccctc aggggtccct 180  
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240  
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggttatgtg 300  
gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccc 354

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 378

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 63

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

32/63

tcctgcaagg cttctggagg caccttccac aaccatgcaa tcaactgggt gcgacaagcc 120  
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcaccccta tccttggttc agcaaactac 180  
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag gacagcctac 240  
atggagctga gcggcctgac atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacttg 300  
ggagctacga cgggctgggg gcaaaagtac tacaacggta tggacgtctg ggggcaaggg 360  
acaattgtca ccgtctcg 378

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 345

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 64

tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60  
acatgccaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120  
caggccccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat ccagaccga 180  
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcaactggggc tcaggcgga 240  
gatgaggctg actattactg taactcccgg gacagcagtg gtaaccatta tgtcttcgga 300  
actgggacca aggtcacgt tctaggtcag cccaaggcca acccc 345

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 375

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

33/63

&lt;400&gt; 65

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60  
tcctgcaagg cttctggagg caccttccac aaccatgcaa tcaactgggt gcgacaagcc 120  
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagag atcacccctt tccttggttc agcaaactac 180  
gcacagaagt tccagggcag agtcacaatt accgcggacg aatccacgag gacagcctac 240  
atggagctga gcggcctgac atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacttg 300  
ggagctacga cgggctgggg caaaagtact acaacggtat ggacgtctgg ggcaaggac 360  
acggtcaccg tctcg 375

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 345

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 66

tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60  
acatgccaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120  
caggccccctg tacttgtcat ctatgggaaa aacaaccggc cctcagggat ccagaccga 180  
ttctctggct ccagctcagg aaacacagcc tccttgacca tcaactggggc tcaggcgga 240  
gatgaggctg actattactg taactcccgg gacagcagtg gtaaccatct ggtgttcggc 300  
ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg ccccc 345

&lt;210&gt; 67



34/63

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 67

gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120  
ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aactgatgg tgggacaaca 180  
gactacgctg caccctgtaa aggagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240  
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300  
ggggacggca gcagctggaa ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcg 360

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 68

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
tcttggtctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg taaactggta ccagcagctc 120  
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcggccctc aggggtccct 180  
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240  
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggttatgtc 300  
ttcggaattg ggaccaaggt caccgtccta ggtcagccca aggccaaccc cactgtcact 360  
ctgttcccgc cctcctctga ggagctccaa gccaac 396

35/63

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 399

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 69

```
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaacgtc 60
tcctgcaagg tttctggagg catcttcagc aactatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacagg ggcttgagtg gatgggaggg atcgtcccta tatttggaac accaaactac 180
gcacagaggt tccaggacag agtcacaatc acgtcggacg aatcaacgac cacagtctac 240
atggagttga gcagcctgac atctgcggac acggccgttt atttctgtgc gagagatgag 300
gggcattgtg gtgaaaccgc ctgctcgggg ctatggtctc ccgaactctt ctactactac 360
atggacgtct ggggcgaggg gaccacggtc accgtctcg 399
```

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 342

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 70

```
gacatcgtga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
```

36/63

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactetca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgatcac cttcggccaa 300  
gggacacgac tggagattaa acgaactgtg gctgcaccat ct 342

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 71

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60  
acctgcactg tcgctggtgc ctccgtcagc agtgacaatt actactggac ctggatccgg 120  
cagccccccg ggaagggact ggagtggatt gggtttttct cttacagtga gagcaccaac 180  
tataatccct ccctcaagag tcgagtcacc atgtcaatag acacgtccaa gaaccagctc 240  
tcctgaagc tgagttctgt gaccgctgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300  
ggttggagtg ggagttatth tgactattgg ggccggggaa ccctgggtcac cgtctcg 357

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 72

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

37/63

atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg 180  
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300  
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 73

caggtgcagc tacaggagtc ggggggaggc ttggtacagc ctggagggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag gttctggatt catcttcagc ggttatgaaa tgaattgggt ccgccaggct 120  
ccaggggaagg ggctggagtg gatctcatac attagtagta gtggtagtac catatactac 180  
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgcgaagaa ttcactgcat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gcgagatata 300  
cgaagtttcg atttttggag tggttattat gtcggttttt cctcgggtgg cggtatggac 360  
gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcg 393

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

38/63

&lt;400&gt; 74

gacatcgtga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccatcac cttcgccaa 300  
gggacacgac tggagattaa a 321

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 75

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcaat tactatggca tgaactgggt ccgccaggct 120  
ccagggaagg ggctggaatg ggtctcgtcc attagtagtg gtgggactta catacactac 180  
tcagactcag tgaagggccg attcacgctc tccagagaca acgccaagaa ttactgttt 240  
ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctatattt attactgtgc gagagattgg 300  
gaaagtcata gttacgccct tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcg 357

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 339

39/63

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 76

```
caggctgtgc tcactcagcc gtcctcagtg tctgggggtcc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcadc tatggtaaca gcaatcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggttc 240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcat 300
gtggtattcg gcggaggac caagctgacc gtcctaggt 339
```

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 77

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtggag cctctggatt caccttcaat acctatgcaa tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggatggagtg ggtggcagtt gtttcagatg gtggaggcaa taggtactat 180
gcagcctccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa taccttgttt 240
ctgcaattga acacctgag acctgaggac acggctgtct attactgtgc gagatctcgg 300
gggaaccact actactacgg catggacgtc tggggccgag ggaccacggt caccgtctcg 360
```

40/63

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 78

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgtc gggcgagtca gggatattagc agttggttag cctgggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaatt tccccctcac ttccggcgga 300  
gggaccaagg tggagatcaa a 321

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 79

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15  
  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

41/63

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50

55

60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Lys Gln Phe Ser Leu

65

70

75

80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Gly Gln Pro Phe Leu Gln Arg Ser Leu Tyr Pro Gly Ala Val Trp His

100

105

110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115

120

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 80

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln



42/63

1	5	10	15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn			
20	25	30	
Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
35	40	45	
Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
50	55	60	
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln			
65	70	75	80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu			
85	90	95	
Asn Gly Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
100	105	110	
Gln Pro Lys Ala Ala Pro			
115			

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 126

43/63

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 81

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe His Asn His

20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Thr Pro Ile Leu Gly Ser Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Arg Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Gly Ala Thr Thr Gly Trp Gly Gln Lys Tyr Tyr Asn

100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser

44/63

115

120

125

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 82

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His  
85 90 95

45/63

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys  
100 105 110

Ala Asn Pro  
115

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 83

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe His Asn His  
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Glu Ile Thr Pro Phe Leu Gly Ser Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

46/63

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Arg Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Gly Ala Thr Thr Gly Trp Gly Lys Ser Thr Thr Thr  
100 105 110

Val Trp Thr Ser Gly Ala Arg Asp Thr Val Thr Val Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 84

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

47/63

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His  
85 90 95

Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys  
100 105 110

Ala Ala Pro  
115

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 85

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

48/63

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala

20

25

30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Gly Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala

50

55

60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65

70

75

80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85

90

95

Tyr Cys Thr Thr Gly Asp Gly Ser Ser Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115

120

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

49/63

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 86

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

Asn Gly Tyr Val Phe Gly Ile Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln  
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu  
115 120 125



50/63

Leu Gln Ala Asn

130

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 133

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 87

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1

5

10

15

Ser Val Asn Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ile Phe Ser Asn Tyr

20

25

30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Arg Phe

50

55

60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Glu Ser Thr Thr Thr Val Tyr

65

70

75

80

51/63

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Glu Gly His Cys Gly Glu Thr Ala Cys Ser Gly Leu Trp

100

105

110

Ser Pro Glu Leu Phe Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Glu Gly Thr

115

120

125

Thr Val Thr Val Ser

130

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 88

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

52/63

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 89

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

53/63

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ala Gly Ala Ser Val Ser Ser Asp

20

25

30

Asn Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Phe Phe Ser Tyr Ser Glu Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Glu Gly Trp Ser Gly Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

54/63

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 90

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser

115 120

55/63

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 131

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 91

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Ile Phe Ser Gly Tyr

20

25

30

Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu His

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

56/63

Ala Arg Asp Ile Arg Ser Phe Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Val Gly

100

105

110

Phe Ser Ser Gly Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

115

120

125

Thr Val Ser

130

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 92

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

57/63

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 93

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Tyr Tyr  
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45



58/63

Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Ile His Tyr Ser Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe

65

70

75

80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Trp Glu Ser His Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 94

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Pro Gly Gln

1

5

10

15

59/63

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly

20

25

30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35

40

45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50

55

60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Phe

65

70

75

80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser

85

90

95

Leu Ser Gly His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100

105

110

Gly

&lt;210&gt; 95

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

60/63

&lt;400&gt; 95

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Met Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Val Ser Asp Gly Gly Gly Asn Arg Tyr Tyr Ala Ala Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Thr Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Arg Gly Asn His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly  
100 105 110

Arg Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
115 120

61/63

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 96

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

62/63

100

105

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 97

taatacgact cactataggg

20

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 98

63/63

attaataaga gctatcccgg

20

- 
- (1) 開示の日 2000年11月25日 (25. 11. 00)  
開示の種類 刊行物発表  
Publication  
刊行物の名称 第23回日本分子生物学会年会  
プログラム・講演要旨集  
The 23rd Annual meeting of  
the Molecular Biology  
Society of Japan Program,  
Proceeding.
- (2) 開示の日 2000年12月15日 (15. 12. 00)  
開示の場所 第23回日本分子生物学会年会  
The 23rd Annual meeting of the  
Molecular Biology Society of  
Japan  
開示の種類 学会発表  
Presentation at the Meeting  
学会の名称 日本分子生物学会  
The Molecular Biology Society  
of Japan
-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01298

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/00// C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/00, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GenSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JICST FILE(JOIS),  
MEDILINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anne-Marie Cuisinier, et al., "IgM $\kappa$ / $\lambda$ EBV human B cell clone...", <i>Molecular Immunology</i> (1992) Vol.29, No.11, pp.1363-1373 (see amino acid sequence of E29.1 in Fig.5)	28
A	Achim Knappik, et al., "Fully synthetic humencombinatorial antibody libraries...", <i>J.Mol.Biol.</i> (11 February, 2000) Vol.296, No.1, pp.57-86	1-4, 18-25, 27, 28, 30
A	Melvyn Kittle, et al., "Generation of a large complex antibody library from multiple donors", <i>Journal of Immunological Methods</i> (1999), No.1.231, pp.3-9	1-4, 18-25, 27, 28, 30
A	Marcin Czerwinski, et al., "Only selected light chains combine with a given heavy chain to confer specificity for a model glycopeptide antigen", <i>The Journal of Immunology</i> (1998), Vol.160, No.9, pp.4406-4417	1-4, 18-25, 27, 28, 30
A	Yoshikazu KUROSAWA "Jinkou Koutai Library Sakusei to Rinshou Ouyou", <i>Rinshou Men eki</i> (1996), Vol. 28, No.8, pp.1077-1085	1-4, 18-25, 27, 28, 30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 May, 2001 (17.05.01)Date of mailing of the international search report  
29 May, 2001 (29.05.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01298

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 91/10737, A1 (Molecular Affinities Corporation), 25 July, 1991 (25.07.91) (Family: none)	1-4, 18-25, 27, 28, 30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01298

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 5-17,26,29  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Although the statement in the description is taking into consideration, it is unknown what are involved and what are not involved in the scopes of "library", "clone", "immunoglobulin fragment" and "gene" as described in the above claims. Namely, these claims are described in an extremely unclear manner. It is therefore impossible to practice any meaningful international search on these claims.

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/00 // C12P21/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/00, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JICSTファイル (JOIS),  
 MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Anne-Marie Cuisinier, et al. "IgM $\kappa$ / $\lambda$ EBV human B cell clone ...", Molecular Immunology (1992) Vol. 29, No. 11, p. 1363-1373 (see amino acid sequence of E29.1 in Fig. 5)	28
A	Achim Knappik, et al. "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries ...", J. Mol. Biol. (11.2月.2000) Vol. 296, No. 1, p. 57-86	1-4, 18-25, 27, 28, 30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.05.01

国際調査報告の発送日

29.05.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Melvyn Little, et al. "Generation of a large complex antibody library from multiple donors", Journal of Immunological Methods (1999) Vol.231, p.3-9	1-4, 18-25, 27, 28, 30
A	Marcin Czerwinski, et al. "Only selected light chains combine with a given heavy chain to confer specificity for a model glycopeptide antigen", The Journal of Immunology (1998) Vol.160, No.9, p.4406-4417	1-4, 18-25, 27, 28, 30
A	黒沢良和 「人工抗体ライブラリー作製と臨床応用」 臨床免疫 (1996) 第28巻, 第8号, p.1077-1085	1-4, 18-25, 27, 28, 30
A	WO, 91/10737, A1 (Molecular Affinities Corporation) 25. July. 1991 (25.07.91) ファミリーなし	1-4, 18-25, 27, 28, 30

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 5-17, 26, 29 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
前記請求の範囲に記載の「ライブラリー」、「クローン」、「イムノグロブリン断片」及び「遺伝子」について、明細書の記載を参酌しても、具体的にはどのようなものが包含され、どのようなものが包含されないのかが不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲については、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとその国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。